



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DOS  
ALIMENTOS**

**Heloisa Helena Kreibich**

**QUALIDADE E SEGURANÇA DAS AMÊNDOAS DE CACAU  
(*Theobroma cacao L.*) E SEUS PRODUTOS COM RELAÇÃO AOS  
CONTAMINANTES BIOLÓGICOS E A DESCONTAMINAÇÃO  
DE FUNGOS TOXIGÊNICOS COM OZÔNIO GASOSO**

**Florianópolis, SC  
Fevereiro 2016**





**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DOS  
ALIMENTOS**

**Heloisa Helena Kreibich**

**QUALIDADE E SEGURANÇA DAS AMÊNDOAS DE CACAU  
(*Theobroma cacao* L.) E SEUS PRODUTOS COM RELAÇÃO AOS  
CONTAMINANTES BIOLÓGICOS E A DESCONTAMINAÇÃO  
DE FUNGOS TOXIGÊNICOS COM OZÔNIO GASOSO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do Grau de mestre em Ciências dos Alimentos.

Orientadora: Prof<sup>ra</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vildes Maria Scussel

**Florianópolis, SC  
Fevereiro 2016**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Kreibich, Heloisa Helena

QUALIDADE E SEGURANÇA DAS AMÊNDOAS DE CACAU (*Theobroma cacao* L.) E SEUS PRODUTOS COM RELAÇÃO AOS CONTAMINANTES BIOLÓGICOS E A DESCONTAMINAÇÃO DE FUNGOS TOXIGÊNICOS COM OZÔNIO GASOSO / Heloisa Helena Kreibich ; Orientadora ; Vildes Maria Scussel - Florianópolis, SC, 2016.

168 p.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

Inclui referência

1. Ciência dos Alimentos. 2. *Theobroma cacao*. 3. Fungos. 4. Sujidades. 5. Gás ozônio. I. Scussel, Vildes Maria. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. III. Título.

**Heloisa Helena Kreibich**

**QUALIDADE E SEGURANÇA DAS AMÊNDOAS DE CACAU  
(*Theobroma cacao* L.) E SEUS PRODUTOS COM RELAÇÃO AOS  
CONTAMINANTES BIOLÓGICOS E A DESCONTAMINAÇÃO  
DE FUNGOS TOXIGÊNICOS COM OZÔNIO GASOSO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em  
Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade  
Federal de Santa Catarina, como requisito final à obtenção do título de  
Mestre em Ciência dos Alimentos.

Florianópolis, fevereiro de 2016.

---

Profª. Drª. Roseane Fett  
Coordenadora do Programa de Pós Graduação em Ciência dos  
Alimentos

**Banca Examinadora:**

---

Profª. Drª. Vildes Maria Scussel  
UFSC – Presidente

---

Profª. Drª. Elisa Helena Smoecke  
UFSC

---

Profª. Drª. Geovana Dagostim Savi  
UFSC

---

Profª. Dr. César Damian  
UFSC



## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por ter me proporcionado saúde e força para concluir esta etapa da vida.

À minha orientadora, Profa. Dra. Vildes M. Scussel, pela oportunidade de ser componente de seu grupo de pesquisa, por oportunizar meu crescimento pessoal e profissional e pela sua dedicação na orientação deste trabalho.

À minha família, que mesmo longe estão sempre presentes em meu coração.

Aos professores da banca examinadora, pelo aceite do convite para participar desse trabalho com suas valorosas contribuições. Muito obrigada pela grande honra e prazer de poder contar com suas presenças, interesse, colaboração e competência.

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, pela oportunidade da realização do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio bolsa concedido.

À Comissão Executiva do Plano de Lavoura Cacaueira (CEPLAC), pelo fornecimento de amostras e dados necessários para complementação do trabalho.

Às minhas amigas e amigos do LABMICO, pelo conhecimento, pelas palavras de apoio e pelos momentos de descontração.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho, o meu mais sincero **MUITO OBRIGADA!!!**





## RESUMO

O setor produtivo do cacau tem obtido resultados positivos com o aumento de seu consumo no país e no exterior, resultando em crescimento na produção e aumento dos preços no mercado interno e externo. A qualidade das amêndoas de cacau pode ser alterada no cultivo e armazenamento por insetos, ácaros e fungos, podendo atingir a parte comestível. O objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade e segurança de amêndoas de cacau e seus produtos, com o intuito de otimizar etapas de cultivo, processamento, armazenamento e, consequentemente, propiciar maiores ganhos econômicos, através do aumento da qualidade do chocolate. Além disso, avaliar o efeito do gás ozônio na descontaminação de fungos em amêndoas de cacau. Foram realizados três trabalhos (1) [Título: **Qualidade dos ovos de Páscoa e outros produtos de cacau (*Theobroma cacao* L.): insetos, ácaros, fungos e embalagens versus pontos críticos de controle**]; (2) [Título: **Controle de condições de armazenamento e processamento de amêndoas de cacau (*Theobroma cacao* L.) para a produção de chocolates seguros**] e (3) [Título: **Descontaminação pelo gás ozônio de amêndoas de cacau (*Theobroma cacao* L.) inoculadas com *Aspergillus flavus***]. No trabalho (1) foram avaliadas características do produto interno e suas embalagens de produtos de chocolate de diferentes marcas, coletados em supermercados de Florianópolis, no período de Março / 2013 a Março / 2014. As amostras foram coletadas randomicamente e transportadas para o LABMICO, para análises de sujidades, micológicas, embalagens, umidade e atividade de água. Com relação aos resultados obtidos, os produtos de chocolate apresentaram 53% de amostras com contaminantes biológicos, incluindo insetos, larvas, ácaros e fungos. Fungos foram encontrados em 41% das amostras, predominando *Penicillium*, *Aspergillus* e *Rhizopus*. Em relação as embalagens, 9% estavam em desacordo, com a presença de manchas, perfurações, insetos e larvas. Além disso, um total de 15% dos conteúdos internos apresentaram oxidação, odor rançoso, manchas, perfurações e larvas vivas na massa do chocolate. A presença de contaminantes biológicos nos alimentos é um indicativo de descuido com o controle higiênico-sanitário durante o processamento. Embalagens impróprias podem permitir a passagem destes contaminantes para o próprio chocolate, o que reduz substancialmente a sua qualidade. No trabalho (2) foram avaliadas a segurança das amêndoas de cacau (etapas de processamento, instalações de armazenagem contra sua exposição às condições ambientais), coletados de diferentes fazendas produtoras de

cacau e armazéns, no sul da Bahia, no período de Março / 2014 a Julho / 2014. Com relação aos resultados obtidos, foi possível observar que 67% das instalações nas fazendas e armazéns avaliados não apresentam ambiente automático, incluindo as configurações de controle (ou seja, equipamento de aeração e temperatura). É importante ressaltar que os danos mecânicos ou biológicos provenientes do ataque de insetos e roedores nas amêndoas favorecem a absorção de umidade e facilitam a invasão e a penetração de fungos na parte comestível das amêndoas, levando ao rápido desenvolvimento de fungos e produção de micotoxinas. No trabalho (3) foram avaliados o efeito do ozônio (O<sub>3</sub>) utilizado como método químico de descontaminação em amêndoas de cacau contaminadas artificialmente com cepas de fungos de armazenamento. Com relação aos resultados obtidos, este mostrou eficiência com a inibição imediata de 87% de esporos de *A. flavus* após tratamento com gás ozônio na concentração de 60 µmol/mol e 180 min de exposição. Além disso, as amêndoas não apresentaram rancidez oxidativa após a sua aplicação. Sob as condições de estudo, o tratamento mais eficaz, obtendo inibição de 100% dos esporos ocorreu após 30 dias de armazenamento das amêndoas. O gás O<sub>3</sub> tem vantagens por ser internacionalmente reconhecido como seguro, além de ser considerado um método promissor de descontaminação em indústrias e unidades armazenadoras por não deixar resíduos nos alimentos. O presente estudo pode servir de interesse e subsídio para os produtores de cacau, armazéns e indústrias de chocolate entender as suscetibilidades de deterioração, frente aos contaminantes, como sujidades, fungos e micotoxinas, além de despertar interesse das agências reguladoras para futuros ajustes e aplicações sobre medidas preventivas e de controle para melhorar a qualidade e segurança do produto.

**Palavras-chaves:** *Theobroma cacao*. Contaminação. Fungos. Sujidades. Gás ozônio.

## ABSTRACT

The production of the cocoa sector has obtained positive results with an increase in its consumption in the country and abroad, resulting in a growth of production and the prices improvement in the domestic and foreign markets. Cocoa beans can be attacked during cultivation and storage by insects, mites and fungi, and can reach the edible part, as well as being incorporated into chocolate products. The objective of this study was to evaluate the quality and safety of cocoa beans and their products, in order to optimize stages of cultivation, processing, storage and consequently provide greater economic gains by increasing the quality of the chocolate. They conducted three studies (1) [Title: **Easter eggs and other cocoa (*Theobroma cacao* L.) products quality: insects, mites, fungi and packaging versus control points**]; (2) [Title: **Cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans processing and storage conditions control for safe chocolate products**] and (3) [Title: **Decontamination of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) inoculated with *Aspergillus flavus* by ozone gas**]. In (1) characteristics were evaluated domestic product and its packaging of chocolate products of different brands, collected in Florianopolis supermarkets, from March / 2013 to March / 2014. The samples were collected randomly transported to the LABMICO to analysis of light filth, mycological, packaging, moisture and water activity. Regarding the results, the chocolate products showed 53% of samples with biological contaminants. Fungi were found in 41% of samples, predominantly *Penicillium*, *Aspergillus* and *Rhizopus*. Despite this, the packaging, 9% were at odds with the presence of stains, holes, insects and larvae. In addition, a total of 15% of the internal contents showed oxidation, rancid odor, staining, and live larvae perforations in the chocolate mass, quite disgusting to consumers. In (2) were evaluated the safety of cocoa beans (processing steps, storage facilities against their exposure to environmental conditions), collected from different farms producing cocoa and warehouses in the south of Bahia, in the period March / 2014 to July / 2014. Regarding the results, the facilities of the farms and evaluated warehouses, 67% have no automatic environment, including control settings (ie, aeration and temperature). Importantly, biological or mechanical damage from the attack of insects and rodents in almonds favor moisture absorption and facilitate the invasion and penetration of fungi in the edible part of cocoa beans, leading to the rapid development of mold and mycotoxin production. In (3) were evaluated the effect of ozone (O<sub>3</sub>) used as a chemical decontamination method in cocoa beans artificially infected

with strains of storage fungi *Aspergillus flavus*. Regarding the results, it showed efficiency with immediate inhibition of 87 % of spores of *A. flavus*. In addition, coco beans showed no rancidity oxidativa after application. Under the study conditions, the most effective treatment was 60  $\mu\text{mol/mol}$  concentration of  $\text{O}_3$  with longer exposure time (180 min) to give 100% inhibition of the spores.  $\text{O}_3$  gas has advantages because it is internationally recognized as safe, and is considered a promising method of decontamination in industrial and storage units not leave residues in food. This study can serve as interest and benefit to cocoa producers, warehouses and chocolate industries understand the deterioration of susceptibilities, against the growth of light filth, fungi and mycotoxins, and regulatory agencies for future adjustments and applications on preventive measures and control to improve the quality and safety of the product.

**Keywords:** *Theobroma cacao*. Contamination. Fungi. Light filth. Ozone gas

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

Figura 1 - Fruto de cacau (corte transversal): (a) cotilédone; (b) placenta e (c) polpa mucilagínosa. ....	35
Figura 2 - Frutos do cacau: (a) Variedades de Criollo com semente oval; (b) Forastero com semente achatada e (c) Trinitário. ....	36
Figura 3 - Semente de cacau (corte longitudinal): (a) película/testa; (b) cotilédone; (c) gérmen ou embrião. ....	35
Figura 4 - Cacaueiro: (a) infectado pelo <i>Monillioophthora perniciosa</i> ; (b) não infectado; (c) e (d) árvores com sintomas da doença causada pelo fungo (vassoura-de-bruxa). ....	41
Figura 5 - Beneficiamento do cacau em amêndoas torradas. ....	43
Figura 6 - Peneira separadora utilizada na separação das cascas das amêndoas. ....	44
Figura 7 - Produtos derivados de cacau: (a) massa ou pasta de cacau (principal matéria prima do chocolate); (b) manteiga de cacau (fabrício de chocolate e cosméticos) e (c) torta de cacau (fabrício de chocolate em pó e achocolatados). ....	44
Figura 8 - Fluxograma do processo de beneficiamento do cacau à pasta de cacau, manteiga de cacau e torta de cacau. ....	46
Figura 9 - Processamento do cacau ( <i>Theobroma cacao</i> L.) ao chocolate. ....	51
Figura 10 - Fluxograma do processo de fabricação industrial do chocolate. ....	52
Figura 11 - Retirada da polpa e sementes de cacau ( <i>Theobroma cacao</i> L.) ....	53
Figura 12 - Cascas de cacau ( <i>Theobroma cacao</i> L.) separadas para compostagem. ....	54
Figura 13 - Tipos de armazenagem de grãos: (a) <i>convencional</i> , com <i>pallets</i> (produtos empilhados em cargas unitárias) e (b) <i>silos-bolsa</i> (instalados no chão). ....	56
Figura 14 - Armazenamento das amêndoas de cacau ( <i>Theobroma cacao</i> L.): (a) hermético tipo silos bag e (b) em sacos de aniagem. ....	58
Figura 15 - Proliferação de larvas contaminando chocolates comerciais. ....	59
Figura 16 - Fragmentos de insetos (aumento 40 vezes). ....	60
Figura 17 - Ciclo Biológico de traças do gênero <i>Ephestia</i> encontradas em produtos de chocolate. ....	62

Figura 18 - Estruturas químicas das principais aflatoxinas encontradas em alimentos: (a) AFB <sub>1</sub> , (b) AFB <sub>2</sub> , (c) AFG <sub>1</sub> , (d) AFG <sub>2</sub> , e em leite e produtos derivados (e) AFM <sub>1</sub> e (f) AFM <sub>2</sub> .....	66
Figura 19 - Fatores que interferem na ocorrência de micotoxinas na cadeia alimentar.....	68
Figura 20 - Sistema tipo descarga corona de geração de ozônio.....	76
Figura 21 – Fluxograma geral de todo o estudo de controle e descontaminação de amêndoas de cacau ( <i>Theobroma cacao</i> L.) e seus produtos.....	81

### CAPÍTULO III

Figure 1 - Cocoa ( <i>Theobroma cacao</i> L.) (a) mature fruits and (b) beans (post-fermentation) drying steps from the Brazilian state of Bahia....	127
Figure 2 - Itabuna-Ilheus cocoa beans ( <i>Theobroma cacao</i> L.) producing region with its 46 sample collection sites at Bahia state, Brazil.....	129
Figure 3 - Cocoa beans (a) under proper sun drying procedure with protection (wall, covered ceiling, far from soil/floor contact) and (b) improper drying / high humidity allowing fungi proliferation.....	131
Figure 4 - Cocoa beans warehouse facilities: (a) Primary storage, (b) Intermediary and (c) Central storage unity at Bahia state.....	132
Figure 5 - Cocoa beans (a) inicial processing steps (a.1) seed fruit separation: (a.2) fermentation site / air-conditioned environment, (a.3) final fermentation step / temperature control (21 and 24°C); (b) classification equipment: (c.1) humidity control meter, (c.2) three-stages sieves -cleaning/waste/size, (c.3) scales; (d) material applied for bags cocoa on storage: (d.1) hermetic storage, (d.2) closer view, (d.3) jute bag.....	137
Figure 6 - Stereo micrographs of cocoa beans ( <i>Theobroma cacao</i> L.): (a) <i>Premium Type</i> [(a.1) intact <i>shell</i> / (a.2) cracked endosperm]; (b) <i>damaged shell</i> [(b.1) mechanic / (b.2) by insect]; (c) <i>spoilage</i> [(c.1) mites and fungi / (c.2) fungi colonies]. 40 and 150 x.....	138

### CAPÍTULO IV

Figure 1 - Flowchart of the cocoa <i>Aspergillus flavus</i> inoculated treated with ozone gas.....	150
Figure 2 - Effect of O <sub>3</sub> concentration (20 / 40 / 60 µmol/mol) and time of exposure (20 / 105 / 180 min) in cocoa <i>Aspergillus flavus</i> inoculated on (a) total load (CFU) inhibition [(a.1) estimated and (a.2) response	

surface]; (b) total reduction (%) [(b.1) effect estimated and (b.2) response surface] – DAY ZERO.....	156
Figure 3 - Effect of O <sub>3</sub> concentration (20 / 40 / 60 µmol/mol) and time of exposure (20 / 105 / 180 min) in cocoa <i>Aspergillus flavus</i> inoculated on (a) total load (CFU) inhibition [(a.1)estimated and (a.2) response surface]; (b) total reduction (%) [(b.1) effect estimated and (b.2) response surface] – DAY 30 <sup>th</sup> .....	157





## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

<b>Tabela 1</b> - Composição de sementes de cacau da variedade <i>Forastero</i> antes da fermentação, proveniente de países do Oeste Africano.....	38
<b>Tabela 2</b> - Classificação do fungo <i>Moniliophthora perniciosa</i> .....	41
<b>Tabela 3</b> - Principais ingredientes utilizados em produtos de chocolates mais comercializados no Brasil.....	48
<b>Tabela 4</b> - Característica da fluorescência apresentadas pelas aflatoxinas em ordem decrescente de toxicidade, quando observadas sob luz UV à 365 nm.....	65
<b>Tabela 5</b> - Atividade de água mínima para crescimento de fungos toxigênicos e produção de toxinas.....	69
<b>Tabela 6</b> - Limites de tolerância para matérias estranhas, exceto ácaros, em cacau e produtos de chocolates.....	71
<b>Tabela 7</b> - Limites Máximos Tolerados (LMT) de aflatoxinas em amêndoas de cacau e produtos de cacau e chocolate.....	72
<b>Tabela 8</b> - Limites máximos permitidos para aflatoxinas em alimentos em diversos países.....	73
<b>Tabela 9</b> - Agentes oxidantes de seus respectivos potenciais oxidativos.....	77
<b>Tabela 10</b> - Aplicação de ozônio (O <sub>3</sub> ) gasoso em diferentes concentrações e tempos de exposição em alimentos reportados na literatura.....	79

### CAPÍTULO 2

<b>Table 1</b> - Characteristics and integrity evaluation of packaging and internal content of easter eggs and other chocolate products sold in Florianopolis, Souther Brazil.....	115
<b>Table 2</b> - Different light filth and fungi detected in easter eggs and other chocolate products commercialized in Florianopolis, Santa Catarina State, Southern Brazil.....	116
<b>Table 3</b> - Light filth characteristics detected in easter eggs and other cocoa ( <i>Theobroma cacao</i> L.) products commercialized in Florianopolis, their possible contamination risk points and the effects on food / consumers.....	117

**CAPÍTULO 3**

**Table 1 - Itabuna-Ilheus region climate parameters obtained during the cocoa bean study (2014 season) <sup>a</sup>**.....134

**Table 2 - Cocoa farms (primary) & warehouses (intermediate & central) storage characteristics**.....139

**CAPÍTULO 4**

**Table 1 - Factors levels applied in the cocoa ozone gas and exposure time experimental design**.....151

**Table 2 - Levels of ozone *Aspergillus flavus* spores decontamination in dry cocoa bean (*Theobroma cacao* L.) at different gas concentrations and time conditions**.....152

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ABICAB** - Associação Brasileira das Indústrias de Cacau, Amendoim e Balas  
**AFLs** - Aflatoxinas  
**AOAC** - Association of Official Analytical Chemistry  
**APHA** - American Public Health Association  
**APPCC** - Análise de Perigos e Pontos Críticos de controle  
**Aw** - Atividade de Água  
**BPF** - Boas Práticas de Fabricação  
**CASEMG** - Companhia de armazéns e silos do Estado de Minas Gerais  
**CCD** - Cromatografia de Camada Delgada  
**CE** - Comunidade Europeia  
**CEPLAC** - Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira  
**CG** - Cromatografia Gasosa  
**CLAE** - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência  
**CONAB** - Companhia Nacional de Abastecimento  
**DAD** - Disposição de iodo  
**ELISA** - Enzyme Linked Immunosorbent Assay  
**FAO** - Food and Agriculture Organization  
**FD** - Fluorescence detector  
**FDA** - Food and Drug Administration  
**GRAS** - Generally Reconized as Safe  
**HPLC** - High Performace Liquid Chromatography  
**IBGE** - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística  
**ICCO** - International Cocoa Organization  
**LMR** - Limites Máximos de Resíduos  
**LMT** - Limites Máximos Toleráveis  
**LC/MS/MS** – Cromatografia líquida acoplada à espectometria de massas  
**LOD** - Limit of Detection  
**LOQ** - Limit of Quantification  
**MAPA** - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento  
**Mercosul** - Mercado Comum do Sul  
**OMC** - Organização Mundial do Comércio  
**OMS** - Organização Mundial da Saúde  
**SM** - Stereoscropy  
**UR** - Umidade relativa  
**UV** – Ultravioleta  
**WHO** - World Health Organization



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>25</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>29</b>
2.1 GERAL.....	29
2.2 ESPECÍFICOS.....	29
<b>3 CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>31</b>
3.1 CACAU.....	33
3.1.1 Origem da planta e sua distribuição .....	33
3.1.2 Características do cacau e seus frutos .....	34
3.1.3 Produção e comércio internacional.....	38
3.1.4 Contaminantes do cacau.....	39
3.1.5 Beneficiamento do cacau.....	42
3.2 CHOCOLATE: INGREDIENTES E PROCESSAMENTO.....	46
3.2.1 Tipos de chocolates.....	46
3.2.2 Cadeia produtiva do cacau e chocolate.....	48
3.2.3 Subprodutos do cacau.....	52
3.2.4 Resíduos do cacau.....	53
3.3 ARMAZENAMENTO COMO MÉTODO DE CONSERVAÇÃO .....	54
3.3.1 Tipos de armazenagem.....	55
3.3.2 Controle das condições de armazenagem.....	56
3.3.3 Armazenamento das amêndoas de cacau.....	57
3.4 CONTAMINANTES BIOLÓGICOS EM AMÊNDAS E PRODUTOS DE CHOCOLATE.....	58
3.4.1 Insetos e ácaros.....	59
3.4.2 Fungos.....	63

<b>3.4.3 Aflatoxinas.....</b>	<b>64</b>
<b>3.5 FATORES QUE INTERFEREM NO DESENVOLVIMENTO DE CONTAMINANTES.....</b>	<b>67</b>
<b>3.5.1 Fatores externos.....</b>	<b>68</b>
<b>3.5.2 Fatores internos.....</b>	<b>68</b>
<b>3.6 LEGISLAÇÃO.....</b>	<b>69</b>
<b>3.6.1 Micotoxinas(Aflatoxinas).....</b>	<b>72</b>
<b>3.7 PROCESSOS DE DESCONTAMINAÇÃO DE SUJIDADES, FUNGOS E MICOTOXINAS.....</b>	<b>73</b>
<b>3.7.1 Gás ozônio como método de conservação e detoxificação.....</b>	<b>75</b>
<b>3.7.2 Efeito oxidativo sobre fungos e micotoxinas.....</b>	<b>76</b>
<b>3.7.3 Aplicação de ozônio em alimentos in natura e processados....</b>	<b>77</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>82</b>
<b>4 CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>97</b>
<b>Qualidade dos ovos de Páscoa e outros produtos de cacau (<i>Theobroma cacao</i> L.): insetos, ácaros, fungos e embalagens versus pontos críticos de controle (Artigo Publicado: <i>Easter eggs and other cocoa (Theobroma cacao L.) products quality: insects, mites, fungi and packaging versus critical control points</i>.....</b>	<b>97</b>
<b>5 CAPÍTULO 3 .....</b>	<b>121</b>
<b>Controle de condições de armazenamento e processamento de amêndoas de cacau (<i>Theobroma cacao</i> L.) para a produção de chocolates seguros (Artigo Publicado: <i>Cocoa (Theobroma cacao L.) beans processing and storage conditions control for safe chocolate products</i>).....</b>	<b>121</b>
<b>6 CAPÍTULO 4.....</b>	<b>143</b>

<b>Descontaminação pelo gás ozônio de amêndoas de cacau</b> <b>(<i>Theobroma cacao</i> L.) inoculadas com <i>Aspergillus flavus</i> (Artigo</b> <b><i>Submetido: Decontamination of cocoa beans (<i>Theobroma cacao</i> L.)</i></b> <b><i>inoculated with <i>Aspergillus flavus</i> by ozone gas.....</i></b>	<b>143</b>
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>163</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>165</b>





# 1 INTRODUÇÃO

O cacau (*Theobroma cacao* L.), utilizado em tempos primórdios como moeda de troca, na civilização Asteca, era consumido como bebida em cerimônias especiais, onde os grãos eram triturados juntamente com um vegetal picante (*Capsicum spp*). Contudo, foi considerada bebida amarga não apropriada para consumo humano pelos conquistadores da América, os quais o substituíram por açúcar, dando origem ao produto, conhecido atualmente como chocolate. Foi dessa forma que o chocolate, através da colonização, se difundiu pela Europa, iniciando a importação das sementes de cacau. No Brasil, foi cultivado primeiramente na Amazônia, seguindo para o Pará, até chegar à Bahia, onde melhor se adaptou ao solo. O cultivo do cacau foi uma das principais atividades desenvolvidas na Microrregião Ilhéus/Itabuna, localizada no Sul da Bahia, formada por 41 municípios. O plantio desse fruto contribuiu para o desenvolvimento da microrregião, bem como para colocar o Brasil entre os maiores exportadores de cacau em nível internacional nos anos 30 até a chegada da doença da vassoura-de-bruxa (*Moniliophthora perniciosa*) que reduziu a sua produção.

Os principais países produtores de cacau são a Costa do Marfim, Indonésia, Gana, Nigéria, Camarões, Brasil, Equador e Togo, os quais detêm 90% de toda área colhida de cacau. Somente os países africanos somam 65% desse total, sendo que a Costa do Marfim e Gana lideram com 24 e 18% da produção, respectivamente. O Brasil ocupa a sexta posição com 7,3% (654 mil hectares) e o estado da Bahia produz 65% do total do cacau brasileiro.

A grande maioria das amêndoas de cacau (*Theobroma cacao* L.) são vendidas ainda com casca (após processo de fermentação e secagem) para armazéns de cacau e para exportação. Em situações de comercialização de amêndoas ensacadas expostas ao ambiente, há maior probabilidade de absorver umidade, favorecer a proliferação de microrganismos e inclusive a infestação por ácaros e insetos. As pragas (insetos, roedores, ácaros) são importantes contaminantes de alimentos, devido aos grandes prejuízos que causam reduzindo a qualidade e por sua relação direta com outras contaminações (fungos e produção de micotoxinas). Os ácaros, que se desenvolvem em produtos armazenados (especialmente com alto teor de gordura/proteína), podem desencadear reações alérgicas.

A qualidade e segurança no processo de chocolates se deve parte ao *pré-processamento* do cacau e parte ao *processo tecnológico* das amêndoas. Embora seja produzido a partir da mistura de cacau, açúcar e leite, a sua produção inicia muito antes na seleção e preparo da pasta de cacau. Para a produção de chocolate de boa qualidade, três etapas do processo são fundamentais: fermentação, torrefação e conchagem as quais envolvem diferentes temperaturas e manuseio do produto.

A presença de contaminantes biológicos nos alimentos é um indicativo de descuido com o controle higiênico-sanitário, durante as fases que envolvem sua produção desde a obtenção da matéria-prima no campo (cultivo, colheita, transporte e beneficiamento), sua seleção na recepção da fábrica e industrialização (manipulação, processamento e embalagem) até o armazenamento, transporte e comércio do produto acabado. Embalagens impróprias podem permitir tanto passagem desses contaminantes bem como de componentes de aroma do próprio chocolate ou de odores externos.

A pasta de cacau brasileira (principal matéria-prima do chocolate) atualmente é de domínio de empresa multinacional que deveria manter sua qualidade e segurança, contudo, muitos relatos vêm demonstrando problemas como a presença de diversos contaminantes biológicos do produto final, levando o consumidor a se preocupar com sua segurança na hora da aquisição ou até mesmo rejeitar determinadas marcas.

Diante dos contaminantes biológicos que podem estar presentes nas amêndoas de cacau e seus produtos, tais como, insetos, ácaros, fungos e micotoxinas; estudar e avaliar novos métodos que possam reduzi-los são de fundamental importância para a qualidade e segurança destes alimentos.

Para isto, o gás ozônio apresenta uma alternativa de descontaminação, com características sanitizantes de interesse para o armazenamento de amêndoas, por ser mais seguro e potente do que os desinfetantes convencionais, agindo sobre um grande número de microrganismos, incluindo patógenos resistentes. Tem sido efetivamente usado para controlar o crescimento de fungos, reduzir a contaminação por micotoxinas, remover resíduos de pesticidas e estender a vida pós-colheita de produtos hortícolas sem reduzir o valor nutricional do alimento.

Considerando a enorme importância que o cacau e produtos de chocolates desempenham na economia nacional, internacional e para exportação, este trabalho propõe a avaliação da qualidade e segurança de amêndoas de cacau e seus produtos. Em adição, realizar a aplicação

de ozônio gasoso em amêndoas de cacau a fim de avaliar os potenciais benéficos deste tratamento, aprimorando sua qualidade e processamento, além de agregar valor ao produto comercial, reduzindo prejuízos decorrentes de produtos de baixa qualidade.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Avaliar a qualidade e segurança das amêndoas de cacau (*Theobroma cacao* L.) e produtos de chocolate com relação a contaminantes biológicos, assim cpomo a eficiência do gás ozônio na descontaminação de fungos toxigênicos.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar a segurança de amêndoas de cacau nas etapas de processamento e armazenamento, quanto a susceptibilidade a deterioração, infecção por fungos, possíveis passos de entrada de fungos, micotoxinas, contaminantes biológicos, bem como recomendar uma implementação de controle para melhorar a qualidade no cultivo, armazenamento, processamento e produto final.
- Verificar a umidade, atividade de água, a presença de espécies fúngicas e sujidades em amêndoas de cacau e produtos de chocolate acondicionados em embalagens fechadas para transporte interno e exportação.
- Aplicar e avaliar a eficiência de descontaminação do gás ozônio frente a espécie toxigênica de *A. flavus*, frequentemente encontrada em amêndoas de cacau.



**CAPÍTULO 3**  
**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**





### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 CACAU (*THEOBROMA CACAO* L.)

##### 3.1.1 Origem da planta e sua distribuição

Uma lenda asteca conta que o Deus da lua roubou uma árvore de cacau da terra dos filhos do sol para presentear seus amigos humanos com a "delícia dos deuses". Segundo Herme (2006), essa lenda influenciou Linneu, que classificou a planta, denominando-a *Theobroma cacao* L., do grego Theo (Deus) e bromo (alimento).

A utilização do cacau foi iniciada no México entre os astecas como oferecimento aos deuses. A população o empregava em cerimônias como bebidas preparada com os frutos do *cacahualth*, cujo nome era *tchocolath* (grãos triturados juntamente com pimentões fervidos até tornar a bebida espumosa) (HERME, 2006). Contudo, os conquistadores da América consideraram a bebida amarga e picante, portanto não apropriada para consumo humano. Surgiu então a ideia de substituir o pimentão por açúcar, dando origem ao produto chocolate. As amêndoas torradas e moídas eram misturadas em água quente até formar espuma e temperadas com baunilha e outras especiarias. Porém o seu uso foi imposto por Hernando Cortez porque, conforme ele próprio escreveu ao imperador Carlos V, uma taça dessa preciosa bebida permitia aos nativos caminhar um dia inteiro sem necessidade de outros alimentos (FRANCO, 2001). Essa fama fez com que com o correr dos anos o cacau se transformasse em moeda onde, por exemplo, 10 favas valiam um coelho (LIMA, 2008).

Do México se expandiu para outros países da América sob o domínio espanhol e a partir de 1520, a Espanha passou a receber o cacau e apareceram as primeiras fábricas chocolateiras. Os espanhóis monopolizaram o comércio do cacau por alguns anos, devido ao segredo do preparo (FRANCO, 2001).

Em 1659 nascia com Luiz XV a primeira fábrica francesa de chocolates concedida pelo rei como privilégio a um cidadão francês a se tornar fabricante principalmente para a aristocracia (HERME, 2006). Os franceses desenvolveram máquinas e processos; em 1819 foi fundada a primeira fábrica suíça de chocolate e em 1831 o processo artesanal passou a ser industrial com a instalação de uma grande fábrica. Em 1870, o leite foi adicionado ao chocolate e se firmou a indústria suíça chocolateira que hoje representa fonte considerável de divisa para os países produtores de cacau e fabricantes do chocolate (FRANCO, 2001).

### 3.1.2 Características do cacau e seus frutos

O cacau pertence à ordem Malvales, família Malvaceae, gênero *Theobroma*, espécie *Theobroma cacao* L., única utilizada comercialmente para a produção de chocolate (MEINHARDT, 2008).

Ao lado da indiscutível importância econômica, o cacau tem um grande valor ecológico. Cultivado racionalmente, em condições que se assemelham às do seu *habitat* natural, em florestas, com um sombreamento permanente de árvores de maior porte, o cacau protege o solo dos efeitos das chuvas da erosão e da lixiviação (carreamento de elementos nutritivos pelas águas). Suas plantações substituem a floresta original sem destruir o ambiente ecológico existente, preservando a heterogeneidade e com ela o microclima e a vida das espécies vegetais e animais das áreas cultivadas (EFRAIM, 2009).

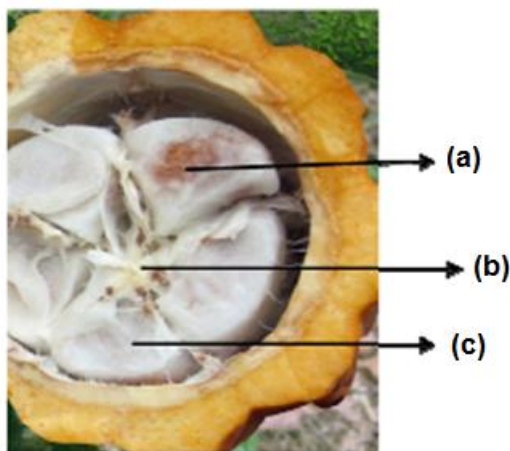
Segundo Batalha (2009), o cacau é árvore essencialmente tropical, cultivado a temperaturas acima de 20°C durante o ano todo. Exige solos profundos com espessa camada de húmus. O cacau fica no viveiro por cerca de um ano, é transplantado seus frutos e cresce ramificado, sendo podado no terceiro ano. Começa a produzir aos quatro anos, atingindo plena produtividade aos doze anos e produz até trinta e cinco anos em média.

Normalmente em um cacau (plantação de cacaueiros) são feitos replantios para garantir a atividade por todo o tempo na área plantada. A época da colheita é variável nas zonas cacaueiras, mas pode ser feita o ano todo. No Brasil a safra comercial vai de maio a setembro. O fruto aparece na árvore, quatro a seis meses após a floração e é composto de casca, polpa e sementes ou amêndoas, sendo que a casca pesa 75% do total. Os frutos são de forma e tamanho semelhantes a um melão, com cerca de 25 cm de comprimento e 10 cm no maior diâmetro (FRANCO, 2001).

As sementes que constituem o cacau e que interessa à indústria processadora têm forma variável medindo 2 cm de comprimento e 1 cm de largura, compondo cerca de 20 a 50 unidades por fruto. As sementes estão envolvidas pela polpa branca, constituída por um conjunto de células esponjosas mucilaginosas contendo água, frutose, glicose, sacarose, ácido cítrico e vários sais inorgânicos, através da placenta (Figura 1). A testa (película protetora da semente) secreta a mucilagem e atua como via de transporte entre os cotilédones e a polpa mucilaginosa. O cotilédone (contém material nobre para a fabricação do chocolate)

apresenta células contendo reservas proteicas, lipídicas, amido e células polifenólicas. No tecido fresco predominam células contendo numerosos e regulares glóbulos lipídicos que revestem ordenadamente a face interna da membrana celular. As células polifenólicas apresentam um grande e único vacúolo preenchido por polifenóis sendo responsáveis pela cor dos cotilédones (MARTINI, 2004).

Figura 1 - Fruto de cacau (corte transversal): (a) cotilédone; (b) placenta e (c) polpa mucilaginosa.



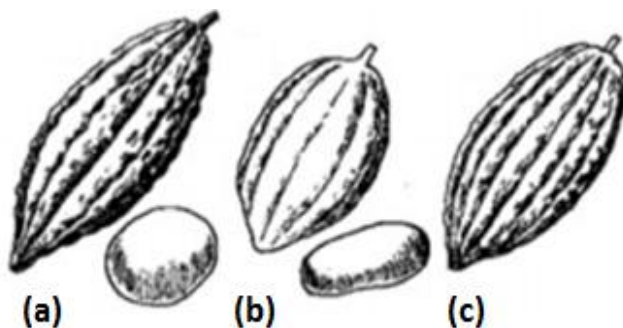
Fonte: MARTINI, 2004

O cacaueiro é uma árvore que atinge 4 a 12 m de altura. As principais espécies brasileiras são o *Criollo* - *Theobroma cacao*, *Linnaeus* e o "*Forasteiro*" ou cacau roxo, *Theobroma leiocarpum*, *Bern.* Este último tem quatro variedades: Comum, Pará, Maranhão e Catongo e representa praticamente, a totalidade do cacau de consumo no mundo atual, incluindo o cacau do Brasil (ELWERS, 2009). Além destes, encontra-se também o *Trinitário* (Figura 2).

Os dois primeiros termos foram aplicados, inicialmente na Venezuela, para distinguir o produto nativo (*Criollo*) do material introduzido (*Forastero*) de fora do país. As três variedades são diferentes, sendo reconhecidas pelo conjunto geral das suas características. Há, no entanto, algumas distinções mais claras: o *Criollo* possui sementes brancas ou de coloração rósea clara e frutos com casca vermelha ou verde, quando imaturo. Já o *Forastero* possui sementes intensamente pigmentadas e frutos verdes e o *Trinitário* é identificado

pela associação de caracteres de ambos os tipos anteriores, com coloração de frutos e sementes variáveis (SOUZA, 2010). As árvores de cacau forasteiro são mais resistentes e possuem um bom rendimento. Os grãos forasteiro roxo púrpura são menos aromáticos que o criollo, ainda que constituem a principal fonte das colheitas mundiais de cacau de consumo. O forasteiro é considerado o cacau que tem certa inclinação a produzir amargor. Já o criollo é uma variedade que possui os sabores de grão fino, constituindo um sabor suave. Os cacaueiros criollos são muito sensíveis às variações climáticas e ao ataque de parasitas, produzindo quantidades relativamente pequenas (BASTOS, 2003).

Figura 2 - Frutos do cacau: (a) Variedades de Criollo com semente oval; (b) Forastero com semente achatada e (c) Trinitário.



Fonte: SOUZA, 2010.

Tanto as sementes de cacau, assim como toda a planta, são afetadas em seu desenvolvimento e constituição química pelas condições ambientais e tratamentos culturais. Sendo que no processo de industrialização, a semente não é aproveitada integralmente, havendo a eliminação da testa e do embrião (Figura 3) (EFRAIM, 2004). É importante destacar que o termo semente deve ser utilizado quando o fruto ainda possui um embrião vivo e, portanto pode ser germinado. A denominação amêndoas, por sua vez, é utilizada a partir do momento que se tem a morte do gérmen/embrião (com as transformações provocadas pela fermentação) e consequente perda da capacidade de germinação.

O cacau possui uma composição química única, com mais de 500 compostos, dentre os quais merecem destaque as metilxantinas. Classificadas como alcaloides purínicos, são consideradas substâncias

estimulantes, e as encontradas no cacau são: teobromina, em maior concentração, seguida da cafeína (BORCHERS et al, 2000).

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina) é a mais comum, sendo encontrada principalmente em chás, cafés, produtos de cacau e bebidas à base de cola. Seus efeitos fisiológicos na saúde humana incluem estimulação do sistema nervoso central, dos músculos cardíacos, do sistema respiratório e da secreção de ácido gástrico. Também é considerada como um diurético fraco e relaxante muscular. Já a teobromina (3,7 dimetilxantina) é encontrada, sobretudo, em produtos de cacau e tem ação diurética (EFRAIM, 2004).

Afoakwa (2007) em seus estudos apontou razões de interesse no grupo das metilxantinas. Entre elas está a contribuição do sabor amargo do chocolate, juntamente com compostos formados durante a torração; e ainda, possuem efeitos farmacológicos sobre os sistemas nervoso, cardiovascular, gastrointestinal, respiratório e renal. Na Tabela 1 é mostrada a composição química da semente de cacau sem fermentar.

Figura 3 - Semente de cacau (corte longitudinal): (a) película/testa; (b) cotilédone; (c) gérmen ou embrião.



Fonte: GRAPIUNAMENTE, 2002 citado por EFRAIM, 2004.

Tabela 1 - Composição de sementes de cacau da variedade *Forastero* antes da fermentação, proveniente de países do Oeste Africano.

COMPOSIÇÃO	PESO SECO (%)
Lipídios	53,05
Umidade	3,65
Cinzas	2,63
Nitrogênio total	2,28
Nitrogênio proteico	1,50
Teobromina	1,71
Cafeína	0,085
Glicose	0,30
Sacarose	0,58
Amido	6,10
Pectina	2,25
Fibras	2,09
Pentosanas	1,27
Acético	0,014
Oxálico	0,29

Fonte: AFOAKWA, 2007

### 3.1.3 Produção e comércio internacional

De acordo com a *International Cocoa Organization* (ICCO), os maiores produtores mundiais de cacau em termos de toneladas são os países africanos da Costa do Marfim (1.242 mil na safra 2009/10) e Gana (632 mil), seguido pela Indonésia (550 mil). Em seguida, novamente dois países africanos, Nigéria (240 mil) e Camarões (205 mil); e por fim o Brasil (161 mil), Equador (160 mil) e Papua Nova Guiné (50 mil) (ICCO, 2011). Já os países importadores são os Estados Unidos e os integrantes da Comunidade Econômica Europeia, dentre eles a Inglaterra, Suíça, Holanda, Alemanha, Bélgica, Dinamarca, França e Itália (CEPLAC, 2010).

O setor produtivo do cacau brasileiro na Bahia (safra 2013/2014), teve resultados positivos com o aumento de consumo no Brasil e no mundo, resultando em crescimento da produção e melhora de preços no mercado interno e externo. Apesar disto, existem dificuldades de acesso ao crédito por parte dos produtores e em adição, fatores climáticos como chuvas intensas, aumentam a incidência do fungo que causa a doença vassoura de bruxa do cacaueiro, sofrendo

perdas de até 40% na produção. A Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (Ceplac) produz clones maravilhosos de cacau, mas diante da descapitalização dos produtores, não é possível fazer a substituição, tornando-se necessário maiores investimentos na cultura cacaueira. Fatores como esse fazem com que o Brasil precise importar cacau, apesar de ser o sexto maior produtor mundial.

Nos últimos dez anos, a demanda no Brasil cresceu acima de 5% ao ano, tornando-o o 3º maior consumidor de chocolates do mundo. Para atender às indústrias é preciso recorrer ao estoque mundial, elevando o preço do cacau no mercado internacional. O país importa uma média de 1,371 milhões de toneladas para suprir a demanda interna. Na safra 2012/2013 a produção mundial foi de 3,929 milhões de toneladas, enquanto que o consumo chegou a 4,083 milhões de toneladas. Na safra 2013/2014 a produção foi de 4,162 milhões de toneladas e de consumo de 4,195 milhões de toneladas o que caracterizaria dois déficits seguidos (CEPLAC, 2014).

Assim, os cenários da safra mundial 2013/14 apontam melhores preços que os alcançados em 2012, ou seja, acima dos US\$ 2.500,00 a tonelada da amêndoa na Bolsa de Nova Iorque. Todavia, o fator que sustenta toda esta cadeia é o seu principal produto final, o chocolate. A indústria do chocolate fatura em todo o mundo cerca de US\$ 60 bilhões por ano. O Brasil é o quarto maior produtor de chocolate do planeta. De acordo com a Associação Brasileira das Indústrias de Cacau, Amendoim e Balas (ABICAB), a produção de chocolates no Brasil país tem mostrado um aumento (12%) nos últimos anos, passando de 562 mil toneladas no ano de 2010 para 790 mil toneladas em 2013, colocando o país como o terceiro maior mercado consumidor no mundo, perdendo apenas dos Estados Unidos e da Alemanha (ABICAB, 2014). Somente em 2013, o país produziu 18 mil toneladas de chocolate (80 milhões de ovos de Páscoa) apenas para a época da Páscoa e uma das principais razões para o alto consumo foi o atual aumento da renda da população brasileira (CEPLAC, 2013; ABICAB, 2014).

### 3.1.4 Contaminantes do cacau

A *Moniliophthora perniciosa* é o agente etiológico da doença vassoura-de-bruxa do cacaueiro (*Theobroma cacao* L.), a qual constitui na principal limitação para a produção de cacau na América do Sul, Panamá e ilhas do Caribe. Tem sido considerada como um dos patógenos mais importantes para essa cultura do cacau. A tabela 2 apresenta a classificação do fungo *Moniliophthora perniciosa*. No Brasil

é encontrada contaminando a bacia Amazônica e o sul da Bahia, onde tem causado sérios problemas econômicos, sociais e ecológicos, principalmente na Bahia, onde perdas ocasionadas pelo fungo chegaram a atingir 100% em algumas fazendas (FALEIRO et al, 2004; RUBINI et al, 2005; SCARPARI, 2005).

O primeiro foco conhecido de vassoura-de-bruxa no sul da Bahia foi encontrado em 1989 no município de Uruçuca - na ocasião a segunda maior concentração de cacaueiros do mundo. Apesar de originário da Amazônia, o fungo (*Moniliophthora perniciosa*) encontrou nessa região condições adequadas para infecção das plantas praticamente durante todo o ano. Além de possuir 700 mil hectares contínuos de cacaueiros suscetíveis, a chuva é distribuída uniformemente durante o ano nessa região, apenas com estiagens curtas, condição essencial para a proliferação (SCARPARI, 2005).

A Figura 4 apresenta as características de um cacaueiro infectado. Nos brotos vegetativos das árvores infectadas surgem grupamentos de flores anormais hipertrofiadas que originam frutos deformados, com aspecto de “morango”, os quais morrem prematuramente. Os frutos infectados ainda jovens apresentam aspecto longo/fino, semelhante à “cenoura”, enquanto que os mais desenvolvidos, ao atingirem a fase adulta, exibem manchas negras, textura dura, denominada *podridão negra*. As vassouras formadas que, de início são verdes, após 4 a 6 semanas morrem, adquirindo coloração castanha escura (SCARPARI, 2005).

Os métodos de controle da vassoura-de-bruxa incluem o controle químico, podas fitossanitárias e resistência genética (LANA, 2004). Dentre os produtos químicos utilizados no controle químico, o óxido cuproso é o que apresenta resultados mais positivos em condições de campo, além de ser recomendado para o controle da podridão parda. Também o principal objetivo desse fungicida é a proteção de frutos jovens, porém sua eficiência não é total, pois há rápida expansão da superfície do fruto nos primeiros três meses, não permitindo boa cobertura dos mesmos (ALVES, BRAGAGNOLO, 2002).

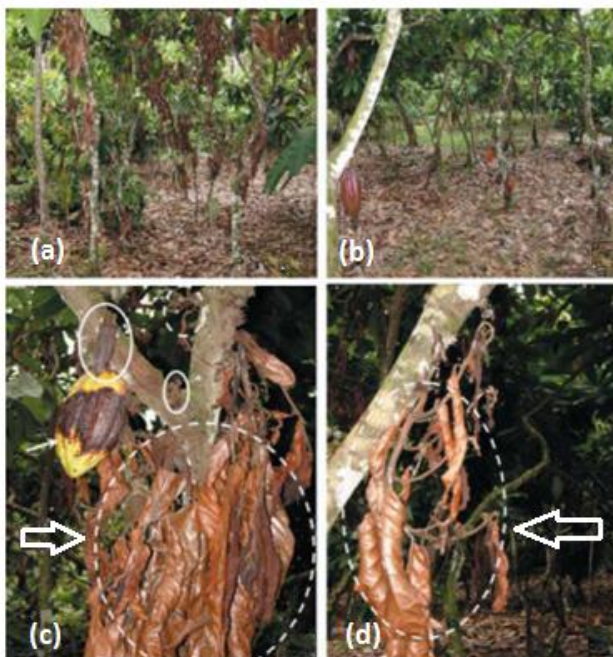


Tabela 2 - Classificação do fungo *Monilliophthora perniciososa*

SUPER-REINO	Eukaryota
REINO	Fungi
FILO	Basidiomycota
SUBFILO	Agaricomycotina
CLASSE	Agaricomycetes
SUBCLASSE	Agaricomycetidae
ORDEM	Agaricales
FAMÍLIA	Marasmiaceae
GÊNERO	<i>Moniliophthora</i>
ESPÉCIE	<i>Monilliophthora perniciososa</i>

Fonte: SCARPARI, 2005

Figura 4 - Cacaueiro: (a) infectado pelo *Monilliophthora perniciososa*; (b) não infectado; (c) e (d) árvores com sintomas da doença causada pelo fungo (vassoura-de-bruxa).



Fonte: MEINHARDT, 2008

### 3.1.5 Beneficiamento do cacau

As sementes deverão sofrer uma transformação, ou seja, a retirada do tegumento (casca) e germe para a obtenção das amêndoas (Figura 5) que são matéria prima para obtenção da pasta de cacau, manteiga de cacau, cacau em pó e finalmente chocolate (Figura 8) (OETTERER, 2006; PONTILLON, 2009).

A cura é a primeira etapa do tratamento do cacau, responsável pela obtenção do fruto como um produto de valor para a comercialização. Separa a semente da polpa para a obtenção da amêndoa seca, apresentando características e composição diferentes da semente fresca (BASTOS, 2003; NACHTIGALL, 1999).

As sementes do cacau são cobertas com sacos de juta ou folhas de bananeira a fim de reduzir perdas de calor e evitar o ressecamento excessivo da camada superficial. Inicia-se, então, a fermentação que inicialmente provoca o inchaço das amêndoas que logo perdem água e adstringência, adquirindo a coloração marrom escura pela mudança dos polifenóis em função da acidez provocada pela alteração de pH. O processo total é concluído aproximadamente entre seis e oito dias e é realizado não só com a intenção de facilitar a separação da polpa e da amêndoa, mas de alterar a amêndoa produzindo os precursores do sabor e do aroma característicos desejados. Ao final da fermentação, as amêndoas apresentam um teor de umidade de 50% a 60% (OETTERER; REGINATO-D'ARCE; SPOTO, 2006).

A etapa seguinte é conhecida como secagem, onde uma grande quantidade de reações químicas ocorre estabilizando a cor marrom do cacau e deixando-o com umidade mínima para o armazenamento. A secagem é realizada em barcaças, colocando-se as amêndoas espalhadas sobre o lastro, onde ficam expostos ao sol. As enzimas que encontram-se presentes atuam no interior das amêndoas, promovendo as reações químicas de cura que reduzem a acidez, dando origem ao sabor, aroma e cor característicos do chocolate. O processo dura entre quatro e cinco dias resultando em um produto com umidade final de cerca de 7% (BECKETT, 1994).

As amêndoas são ensacadas e direcionadas aos armazéns e posteriormente às fábricas. Apresentam, ainda, impurezas como restos de areia, pequenas pedras, fios de sacos, sementes podres e até pedaços de ferro. As amêndoas são então colocadas em uma peneira oscilante, que age com um sistema de sucção que em pouco tempo realiza a operação de limpeza e calibra os grãos por tamanhos (Figura 6). Através de esteiras, as favas são levadas até o sistema de torrefação. Este

processo ocorre nas fábricas (NACHTIGALL, 1999; OETTERER; REGINATO-D'ARCE; SPOTO; 2006).

A torrefação é uma etapa de fundamental importância em que as amêndoas são colocadas no alto de uma torre e vão caindo sustentadas por uma corrente de ar aquecido, que provoca o aquecimento gradual das amêndoas até que cheguem ao fundo torradas. O principal objetivo da torrefação é o desenvolvimento do aroma (BASTOS, 2003). Utiliza-se 120°C de temperatura durante um tempo que varia entre 15 minutos e 2 horas, dependendo do cacau que está sendo processado (NACHTIGALL, 1999).

Durante o processo, as amêndoas perdem água e traços de ácido acético por evaporação e ficam em média com 2,5% de umidade, perdendo 6% de seu peso inicial. A cor que o cacau apresenta após ser torrado é em decorrência da reação de Maillard que ocorre (CEZANO; VICENTE; 1996).

A torrefação prepara as amêndoas para o processo de trituração, tornando mais fácil a retirada de suas cascas (BECKETT, 1994).

Figura 5 - Beneficiamento do cacau em amêndoas torradas.



Fonte: AUTOR.

A trituração tem a finalidade de separar as amêndoas das cascas, além da redução a pedaços cada vez menores através de um triturador com cilindros especiais. Os trituradores modernos produzem seis tamanhos de pedaços, sendo os mais grossos usados para a fabricação do chocolate de primeira qualidade, e os menores para a fabricação de coberturas e cacau em pó (NACHTIGALL, 1999).

As cascas são separadas por peneiragens sucessivas, através de sistemas de ventilação e sucção, aproveitando-se as amêndoas para o

processamento do chocolate (OETTERER; REGINATO-D'ARCE; SPOTO, 2006).

Figura 6 - Peneira separadora utilizada na separação das cascas das amêndoas.

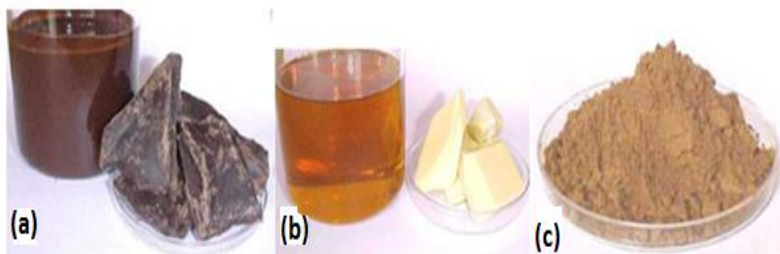


Fonte: OETTERER; REGINATO-D'ARCE; SPOTO, 2006

As amêndoas resultantes da trituração, passam por um processo chamado de moagem, em que um moinho as desintegra, reduzindo-as e formando, assim, uma pasta fluída quase líquida chamada de pasta de cacau, também conhecida por líquor ou massa de cacau. Esta pasta de aroma agradável se origina em função do elevado teor de gordura presente nas amêndoas, que supera 50% de sua composição. Além disso, deve conter no mínimo 50% de manteiga de cacau (BASTOS, 2003).

A pasta de cacau é mantida resfriada em forma de blocos. A partir da solubilização e prensagem da pasta, esta é transformada em dois produtos diferentes conforme o tratamento que receber: manteiga de cacau ou torta de cacau (Figura 7) (BECKETT, 1994).

Figura 7 - Produtos derivados de cacau: (a) massa ou pasta de cacau (principal matéria prima do chocolate); (b) manteiga de cacau (fabrico de chocolate e cosméticos) e (c) torta de cacau (fabrico de chocolate em pó e achocolatados).

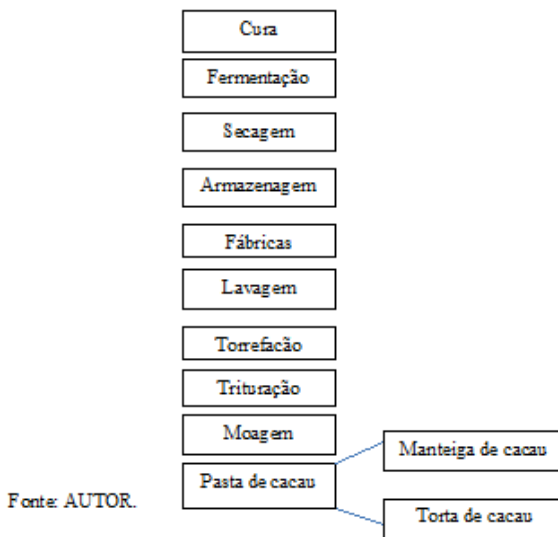


Fonte: OETTERER; REGINATO-D'ARCE; SPOTO, 2006

A *manteiga de cacau* é extraída por prensas hidráulicas. Essa prensa é dotada de tubulações de ar aquecido e funciona com pressão de  $13.300 \text{ kg/cm}^3$ . A seguir a manteiga é filtrada, centrifugada e desodorizada (OETTERER, 2006). As características principais exigidas para a manteiga de cacau comercial são as seguintes: que ela seja dura e friável (que se parte com facilidade, fragmentável) a  $25^\circ\text{C}$ , seja untuosa ao tato, com ponto de fusão no mínimo de  $28^\circ\text{C}$  e no máximo até  $35^\circ\text{C}$ . Para ser de boa qualidade, deve ter acidez inferior a 2% (BASTOS, 2003). O mofo, se presente, pode levar a um aumento da acidez da manteiga, o que a depreciará. Na indústria de chocolates, a manteiga de cacau é uma matéria-prima nobre, de custo elevado (NACHTIGALL, 1999).

A *torta de cacau* é o produto obtido após a solubilização do restante das favas, que após o resfriamento, é acrescida de açúcar para ser submetida a um moinho que torna a chamada torta de cacau em um produto de textura fina. Esse produto deve conter ainda um mínimo de 20% de gordura e deve passar por uma peneira de 0,04mm. Pode ser adicionado o carbonato de potássio (3%) para neutralizar a acidez, intensificar a cor marrom e aumentar a solubilidade do produto em água. A torta de cacau é utilizada para a produção de chocolate em pó, que poderá ser usado no preparo de bebidas e na preparação de doces e bolos, se acrescidas de outros ingredientes secos como açúcar e farinha (NACHTIGALL, 1999).

Figura 8 - Fluxograma do processo de beneficiamento do cacau à pasta de cacau, manteiga de cacau e torta de cacau.



### 3.2 CHOCOLATE: INGREDIENTES E PROCESSAMENTO

A legislação brasileira define *chocolate* como produto obtido a partir da mistura de derivados de cacau (*Theobroma cacao L.*): pasta (ou massa) de cacau, cacau em pó e manteiga de cacau, com outros ingredientes, contendo, no mínimo, 25 % (g/100 g) de sólidos totais de cacau. O produto pode apresentar recheio, cobertura, formato e consistência variados. Já o *chocolate branco* é o produto obtido a partir da mistura de manteiga de cacau com outros ingredientes, contendo, no mínimo, 20% (g/100 g) de sólidos totais de manteiga de cacau. O produto pode apresentar recheio, cobertura, formato e consistência variados (BRASIL, 2005).

#### 3.2.1 Tipos de chocolates

Os produtos de chocolates podem ser classificados em: *Cobertura de chocolate* é o produto homogêneo preparado com pasta de cacau, manteiga de cacau e açúcares, com composição característica ao tipo de chocolate que se refere: amargo, ao leite ou branco. Existem no

mercado coberturas que contêm, em sua formulação, gorduras sucedâneas da manteiga de cacau e que, por isso, não podem ser denominadas de chocolate cobertura (LANNES, 1997).

*Produtos moldados* são chocolates colocados em moldes para solidificar, podendo ser recheados ou não (BECKETT, 1994). Os equipamentos utilizados na confecção dos produtos moldados são constituídos basicamente de uma temperadeira, bicos dosadores, esteira vibratória para retiradas de bolhas de ar, túnel de resfriamento e esteira para alimentação das máquinas de embalagem (MINIFIE, 1983).

O *bombom* é o produto constituído por massa de chocolate ou por um núcleo formado de recheios diversos, elaborados com frutas, pedaços de frutas, sementes oleaginosas, açúcar, leite, manteiga, cacau, licores e outras substâncias alimentícias, recobertos por uma camada de chocolate ou glacê de açúcar (BRASIL, 2005).

Chocolate Diet é o produto com redução calórica, através de uma diminuição na concentração de gordura. Entretanto, quando a concentração de gordura é menor que 27% de seu peso, o chocolate perde a sua suavidade e seu derretimento na boca (NEBESNY; ZYZELEWICZ, 2005). Os principais ingredientes do chocolate dietético, junto com os tradicionalmente utilizados, como pasta de cacau, manteiga de cacau, leite em pó, são manitol, maltitol, xilitol, frutose e sorbitol (BECKETT, 1994).

O conteúdo de açúcar no chocolate é em torno de 30 a 55% (URBANSKI, 2003). O maltitol também pode substituir a sacarose na formulação do chocolate. É termoestável e tem propriedade de massa similar à sacarose, não existindo necessidade de mudança no processamento. A troca da sacarose por maltitol não significa que o produto pode ser etiquetado como livre de açúcar, devido ao açúcar presente em outros ingredientes, como o açúcar do leite usado na formulação do chocolate (URBANSKI, 2003).

A composição do chocolate varia com as diferenças culturais e legislações em relação às concentrações de cacau e sólidos do leite e as quantidades e tipos de gorduras vegetais permitidas. O percentual de cada ingrediente depende da variedade e do tipo de chocolate, sendo os principais produtos comercializados o chocolate meio amargo, chocolate ao leite e o chocolate branco (Tabela 3) (BECKETT, 1994). Os aromatizantes naturais, usados são a baunilha, os bálsamos que contêm ácido benzoico, a canela, o cravo da Índia (ambos têm taninos, resinas, ácido cinâmico e óleos essenciais), noz moscada, óleos essenciais extraídos, de frutas (acetatos, formiatos, butiratos, éter, clorofórmio,

aldeídos, benzoato e ácidos: tartárico, oxálico e benzoico) e o açúcar caramelizado no chocolate ao leite (BECKETT, 1994).

Tabela 3 - Principais ingredientes utilizados em produtos de chocolates mais comercializados no Brasil

TIPO	INGREDIENTES	PASTA DE CACAU (%)
Branco	Açúcar Manteiga de cacau Leite em pó Lecitina	NA*
Ao leite	Açúcar Pasta de cacau Manteiga de cacau Leite em pó e condensado	25 a 39
Meio amargo	Pasta de cacau Manteiga de cacau Pouco açúcar	40 a 55
Amargo	Pasta de cacau Manteiga de cacau Pouco açúcar	56 a 85

NA\*: não aplicável

Fonte: BECKETT, 1994

### 3.2.2 Cadeia Produtiva do cacau e chocolate

As matérias-primas básicas para o processo de fabricação do chocolate é a pasta de cacau, a manteiga de cacau, o açúcar (geralmente a sacarose é o açúcar que mais facilita a moldagem) e o leite em pó. Todos os ingredientes provêm de silos distintos e são selecionados de acordo com a preferência do produtor (OETTERER; REGINATO-D'ARCE; SPOTO; 2006).

A *manteiga de cacau* é um dos ingredientes mais importantes na formulação do chocolate. Pode até constituir 1/3 da formulação, sendo responsável por diversas características de qualidade, como dureza e quebra à temperatura ambiente (*snap*), rápida e completa fusão na boca, brilho e rápido desprendimento de aroma e sabor na degustação. Sua natureza polimórfica define as condições de processo e está diretamente ligada à estabilidade do produto, durante o armazenamento (OETTERER; REGINATO-D'ARCE; SPOTO; 2006). É composta basicamente por triglicerídeos (aproximadamente 98%),



sendo o restante constituído por diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos graxos livres, além de componentes menores solubilizados, tais como esteróis e etocoferóis. Três principais ácidos graxos são encontrados na composição da manteiga de cacau: ácido palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0) e ácido oleico (C18:1) principais triglicerídeos simétricos, que são responsáveis pelas suas propriedades únicas de fusão e cristalização bem definidas (OETTERER; REGINATO-D'ARCE; SPOTO; 2006).

Para a produção do chocolate, a pasta de cacau, a manteiga de cacau, o açúcar e o leite são colocados em um misturador (*malangeur*) que consiste em um recipiente rotativo com leito de granito e base aquecida com serpentina de água quente ou vapor (CENZANO; VICENTE; 1996). Após, as seguintes etapas são realizadas (Figuras 9 e 10):

*Amassamento* - é um processo que consiste em misturar diferentes qualidades de cacau, de acordo com o chocolate que se deseja produzir com a adição de açúcar. Esta mistura pode ser feita através de duas formas diferentes: por amassadoras comuns ou por amassadoras a vácuo. Independente da amassadora usada no processo, as temperaturas utilizadas podem variar entre 45°C e 65°C (OETTERER; REGINATO-D'ARCE; SPOTO; 2006). As amassadoras comuns contém em seu interior, um agitador que realiza movimentos de rotação. Esta máquina é capaz de preparar até duas toneladas de cada vez. Agitando durante aproximadamente 3 horas, produz um chocolate liso, que já poderá ser levado aos processos de refino e conchagem, estando pronto para a modelagem em aproximadamente 24 horas após o término de todos os procedimentos anteriores (NACHTIGALL, 1999). As amassadoras a vácuo homogeneizam o chocolate de forma perfeita. O amassamento dura em torno de 4 horas e elimina qualquer acidez que a massa possa conter. Nestas amassadoras, no caso da produção de chocolate com leite, deve-se optar por usar leite concentrado, pois o leite em pó é difícil de ser moído. Com o vácuo, o resto de umidade que o leite contém é evaporado totalmente e seu aroma é perfeitamente conservado (NACHTIGALL, 1999). Os processos consecutivos deverão ser o refino e a conchagem, que irão permitir o aspecto desejado para que seja feita a modelagem.

*Refino* - O refino tem a finalidade de deixar o chocolate com partículas suficientemente pequenas que não sejam possíveis de serem detectadas pela língua. O processo é feito de acordo com o tipo de chocolate que se deseja produzir. As partículas não devem ultrapassar os 40 micrômetros. Os refinadores deixam o chocolate com a textura suave

necessária. São formados por um conjunto de cinco cilindros metálicos com velocidades variáveis (BASTOS, 2003; OETTERER; REGINATO-D'ARCE; SPOTO; 2006). No refinamento, o teor de gordura do chocolate é 4% menor que o específico e deverá ser corrigido nas etapas seguintes (NACHTIGALL, 1999).

*Maturação* - inicia-se após o refino em que a pasta de chocolate é colocada em uma câmara com temperatura constante de 50°C durante 24 horas, para que a manteiga de cacau mescle bem com o açúcar. Neste período ocorre a maturação da pasta, que logo é retirada da câmara e refinada novamente para que se obtenha uma boa homogeneidade (CEZANO; VICENTE; 1996).

*Conchagem* - constitui como a última etapa de importância na formação do sabor característico e desejável do chocolate. É uma etapa de mistura que envolve a redução da umidade, volatilização dos ácidos graxos e aldeídos, o desenvolvimento da textura uniforme e a mudança da cor devido à emulsificação e oxidação de taninos. A volatilização reduz o amargor e desenvolve o sabor do chocolate. As partículas sólidas, tais como o açúcar e o cacau, são revestidas com gordura, dissociadas pelo atrito tornam-se arredondadas. O principal objetivo desta operação é eliminar os sabores indesejáveis provenientes de certos componentes naturais e desenvolver ou intensificar os sabores desejáveis e característicos do chocolate (BASTOS, 2003). Estes equipamentos contêm agitadores em forma de pás que giram lentamente e trabalham a temperaturas diferentes de acordo com o chocolate em questão para o desenvolvimento do processo, sendo entre 46°C e 52°C no caso do chocolate ao leite e entre 60°C e 70°C no caso do chocolate em tablete e o tempo pode variar de 12 a 16 horas (OETTERER; REGINATO-D'ARCE; SPOTO; 2006). Ocorre nesta etapa a volatilização de 30% de ácido acético e 50% de aldeídos de baixo ponto de ebulição (NACHTIGALL, 1999; OETTERER; REGINATO-D'ARCE; SPOTO; 2006).

*Temperagem* - neste processo, a cor característica do chocolate ao leite é estabilizada pela reação de Maillard. A massa final tem aparência brilhante, odor agradável e dissolve na boca tendo uma textura fina (KREIBICH, 2013). A temperagem envolve agitação, o tempo e a temperatura de cristalização. O tempo de cristalização deve ser o suficiente para que ocorra a formação e o amadurecimento dos cristais estáveis. A temperatura exerce uma função essencial no processo, em fase de ser a força propulsora de cristalização. O processo de temperagem para o chocolate inicia-se com a fusão completa da fase gordurosa do chocolate em 40/50°C. Em seguida é feito um

resfriamento controlado para induzir à cristalização da gordura a 28/29°C, seguido de derretimento dos cristais a 30/32°C.

**Moldagem** - o chocolate temperado é depositado em moldes, onde é resfriado à 18°C, para formar uma massa estável e homogênea (NACHTIGALL, 1999). A moldagem é responsável pela forma de diferentes tipos de chocolate.

**Embalagem** - todas as embalagens devem apresentar uma barreira contra vapor d'água, passagem da luz e não podem permitir a passagem de componentes de aroma do próprio chocolate ou de odores provenientes do ambiente de estocagem. A embalagem deve ser resistente a ataques de insetos e roedores (KREIBICH, 2014).

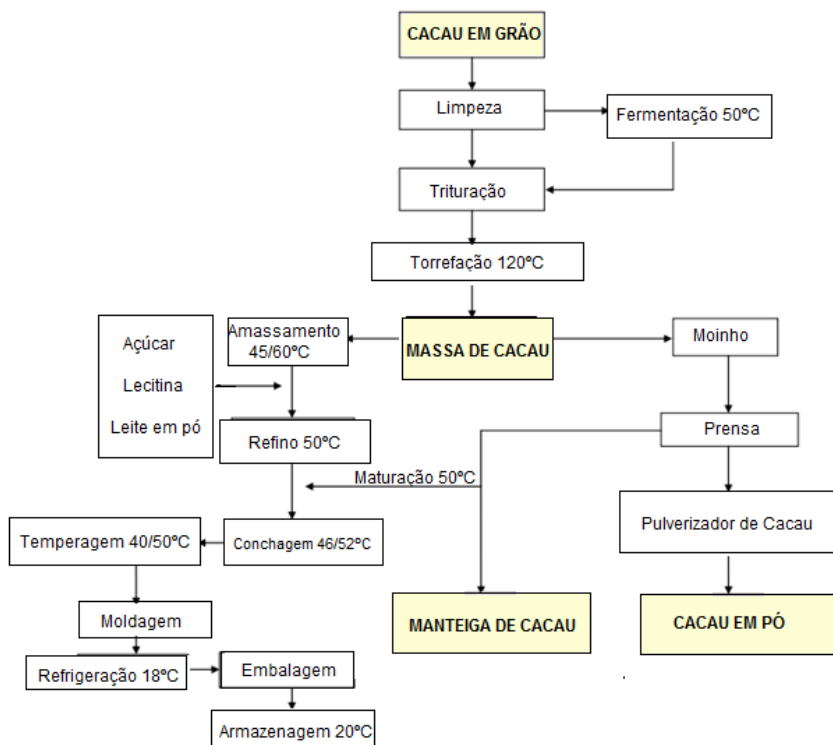
**Armazenagem** - o chocolate deve ser armazenado em locais secos, arejados, baixa temperatura e sem exposição ao sol (BECKETT, 1994). A temperaturas de armazenamento acima de 20°C indica que o conteúdo de gordura tende a difundir para a superfície do produto, cristalizando e causando um aspecto branco, conhecido por floração farinhosa. Pode ocorrer também floração açucarada, quando a água se condensa na superfície do chocolate causando a dissolução do açúcar interior. O chocolate fica com uma capa branca superficial de pequenos cristais de açúcar (BECKETT, 1994; KREIBICH, 2013).

Figura 9 – Processamento do cacau (*Theobroma cacao* L.) ao chocolate.



Fonte: AUTOR

Figura 10 - Fluxograma do processo de fabricação industrial do chocolate.



Fonte: AUTOR

### 3.2.3 Subprodutos do cacau

São compreendidos como subprodutos do cacau: a polpa, o mel e a geleia. A polpa de cacau é um substrato mucilaginoso de coloração branco-leitosa, sabor ácido adocicado, rico em nutrientes, e apresenta boas perspectivas para industrialização devido a seu sabor característico (Figura 11). Quimicamente, assemelha-se à polpa de outros frutos tropicais tais como: bacuri, cupuaçu, graviola (BATALHA, 2009). Já o mel de cacau é um substrato aquoso, transparente, viscoso e de sabor ácido adocicado, rico em açúcares e pectina, extraído da polpa que envolve as sementes frescas. Poderá ser obtido artesanalmente pela prensagem das sementes ou da polpa. Utilizado na fabricação de sorvete,

picolé, bebida energética, aguardente, vinho e vinagre. Sobre a geleia de cacau, esta é feita com o mel de cacau obtido por prensagem e constitui numa mistura com açúcar, submetida à cocção/fervura, até obter a concentração de 65 a 69° Brix ou temperatura de 106 °C (CEPLAC, 2014).

Figura 11 - Retirada da polpa e sementes de cacau (*Theobroma cacao* L.).



Fonte: AUTOR

### 3.2.4 Resíduos do cacau

As cascas são trituradas e transportadas para a compostagem (Figura 12). A casca é um produto rico em microrganismos e materiais fermentáveis. Uma das técnicas recomendadas consiste em utilizar casca fresca para fazer pilhas com 2 a 3 m de largura e cerca de 1 m de altura. As cascas são arrumadas em camadas intercaladas com outros materiais, como dejetos de animais (CEPLAC, 2014). A casca do cacau é rica em fibras, minerais e carboidratos suficientes para utilizá-la como alimento. Neste caso, a casca é fornecida fresca, sendo apenas cortada em pequenos pedaços. Seu volume na alimentação depende das espécies de animais: ruminantes (70%), suínos (20%) e aves (10%) (CEPLAC, 2014).

Figura 12 - Cascas de cacau (*Theobroma cacao* L.) separadas para compostagem.



Fonte: AUTOR

### 3.3 ARMAZENAGEM COMO MÉTODO DE CONSERVAÇÃO

Grande parte da safra de grãos colhida no Brasil é perdida por falta ou por más condições de armazenagem. Em países em desenvolvimento, essas perdas chegam a atingir até 30% em alguns casos, sendo 10% causados diretamente pelo ataque de pragas durante o armazenamento (CONAB, 2014). Após a colheita, a respiração e outros processos metabólicos de grãos continuam ativos, ocasionando na maioria das vezes, perdas significativas de qualidade. Estes processos podem ser diminuídos e/ou retardados através da redução da umidade, forma usada para prolongamento do tempo de conservação. Mesmo com baixa umidade, os grãos perdem qualidade devido à perda de peso e consumo de energia pelo processo respiratório, pelo aumento de rachaduras e ocorrência de pragas e fungos (BRACKMANN, 2002).

O Brasil apresenta clima tropical e umidade relativa alta, sendo assim, o cuidado com os alimentos deve ser redobrado, comprometendo a vida útil e aumentando os riscos de decomposição dos produtos (BRAMORSKI et al., 2005). É importante analisar e manter as condições satisfatórias de controle de temperatura, limpeza, rotatividade e ventilação, garantindo uma possível redução do crescimento microbiano e diminuindo velocidade de reações químicas e enzimáticas que possam deteriorar os produtos.

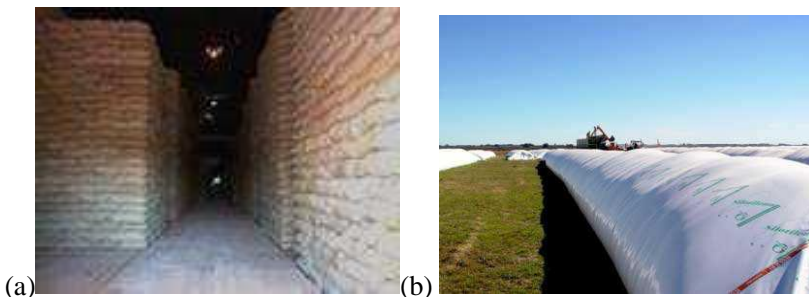
O principal objetivo do armazenamento é manter a qualidade das sementes reduzindo ao mínimo a deterioração. A qualidade das sementes é feita no campo e não poderá ser melhorada, nem em condições ideais de armazenamento, sendo utilizado para a manutenção de estoques no período da entressafra ou para a provisão de quantidades suficientes para atender a demanda de comercialização. No entanto, as mesmas condições de armazenamento que permitem a manutenção da viabilidade das sementes, podem também favorecer a sobrevivência de muitos patógenos importantes para a cultura (BAUDEDEC, 2003).

### 3.3.1 Tipos de armazenagem

No que se refere aos tipos de edificação, a armazenagem pode ser classificada em convencional (produtos acondicionados em um determinado tipo de embalagem, como sacarias), e do tipo a granel (dispensam o uso de embalagens e podem possuir em suas estruturas silos metálicos, concreto e/ou armazéns graneleiros).

*Armazenagem convencional:* formado por um compartimento único em uma unidade armazenadora de fundo plano, sendo apropriado à estocagem de produtos, normalmente em sacos, fardos, caixas, *pallets* e *bags*. A Figura 13a mostra os *Pallets*, que é a plataforma onde são empilhados materiais ou produtos em cargas unitárias, de modo a facilitar o empilhamento vertical e a movimentação horizontal (WEBER, 2005). *Bags* corresponde ao silo tipo bolsa (Figura 13b), instalado no chão e sem cobertura. Representa uma alternativa prática e viável para os pequenos produtores. Consiste num tubo flexível de PVC ou similar e lâminas triplas de polietileno de baixa densidade, podendo preservar a qualidade dos grãos (úmidos ou secos) por até um ano (WEBER, 2005).

Figura 13 9- Tipos de armazenagem de grãos: (a) *convencional*, com *pallets* (produtos empilhados em cargas unitárias) e (b) *silos-bolsa* (instalados no chão).



Fonte: AUTOR

### 3.3.2 Controle das condições de armazenagem

As boas condições de armazenagem devem manter as características que os grãos possuem após o pré-processamento (viabilidade de sementes, a qualidade de moagem e propriedades nutritivas). Entretanto, independentemente do produto ou das características do local, perdas poderão ocorrer durante a sua permanência no armazém (BROOKER et al., 1992).

A deterioração do grão depende do seu teor de umidade, temperatura, oxigênio disponível e microrganismos envolvidos (HALL, 1980). Quando a umidade está baixa ocorre a diminuição da respiração e do metabolismo. A combinação de baixas temperaturas e baixo teor de umidade dos grãos é ideal para a semente se manter viável durante o armazenamento (BRAGANTINI, 2005).

A umidade relativa do ar elevada determina maior grau de umidade das sementes, favorecendo o desenvolvimento de microrganismos, e estes com sua atividade biológica elevam a temperatura da massa de sementes e promovem a aceleração da atividade respiratória das sementes, formando assim uma reação em cadeia que eleva a temperatura e favorece a deterioração das sementes (BRAGANTINI, 2005).

O armazenamento pode ser feito com segurança quando a temperatura de armazenamento for mais baixa, mesmo quando a umidade dos grãos está acima do ideal, pois a baixa temperatura inibe o desenvolvimento de microrganismos e insetos (BRAGANTINI, 2005). Temperaturas elevadas provocam alterações bioquímicas nos grãos,



prejudicando a qualidade do produto durante a secagem. Em grandes volumes de grãos armazenados a granel, o efeito da temperatura é limitado, devido à baixa condutibilidade térmica dos grãos. No entanto, quando o volume da massa é pequeno ou estão em sacarias, o efeito da temperatura ambiente é maior, e ocorre dentro de um período de tempo mais curto. Segundo Weber (1995), os grãos deveriam ser armazenados com temperatura entre 16 e 18°C. O ideal é que as sementes permaneçam armazenadas em um ambiente em que a temperatura não exceda a 25°C e a umidade relativa do ar não ultrapasse 70%.

### **3.3.3 Armazenamento das amêndoas de cacau**

O armazenamento das amêndoas assume importância devido ao longo tempo em que o cacau pode permanecer armazenado. Começa na fazenda produtora em sacos de aniagem de 60 kg por cerca de 30 dias, fica nas cooperativas vários meses e nos armazéns dos portos por cerca de 15 dias (BECKETT, 1994). A amêndoa armazenada deve ter 7% de umidade e estar em equilíbrio com a umidade relativa (UR) do ar (70%). Se aparecer mofo na armazenagem é porque a secagem foi lenta (falta de sol) ou pegou chuva. Pode ser feita a fumigação com brometo de metila ou névoa de pibutrina (CEPLAC, 2014). A temperatura do armazém deve ser elevada para manter a UR do ar a 70%. Em dias de chuva, é necessário fechar as janelas e usar aquecedor solar sobre os telhados. Normalmente, a temperatura no armazém deve estar 5°C acima do ambiente à sombra, sendo que há armazéns que usam ar condicionado e controlam a UR (LIMA, 2007). Neste caso, o tempo de armazenagem é indefinido. Os armazéns devem ser exclusivos e não ter outro aroma que possa ser absorvido pelas amêndoas e piorar a qualidade para exportação (LIMA, 2007).

A CEPLAC se encarrega, na região cacaueira, de dar assistência técnica para a construção dos armazéns. Essa assistência ensina como controlar o ataque de insetos e roedores, como manter um bom nível de higiene, como exterminar pragas e como controlar a umidade e a temperatura.

Figura 14 - Armazenamento das amêndoas de cacau (*Theobroma cacao* L.): (a) hermético tipo silos bag e (b) em sacos de aniagem.



Fonte: AUTOR

### 3.4 CONTAMINANTES BIOLÓGICOS EM AMÊNDOS E PRODUTOS DE CHOCOLATE

Assim como sua matéria-prima (o cacau), os produtos de chocolate são frequentemente atacados por diversas pragas que proliferam em climas quentes nas fábricas e armazéns, como também por predadores oportunistas, como ratos, baratas e formigas, cujos fragmentos podem ser incorporados durante a preparação da massa de chocolates (SILVA JUNIOR, 1996).

A castanha e os diversos grãos utilizados na fabricação de chocolates podem ser atacados por pragas, causando sérios prejuízos. Tais perdas são estimadas em 20%. A evidência da contaminação dos alimentos industrializados por insetos é decorrente da presença de pequenos fragmentos do exoesqueleto (Figura 16), como também outros contaminantes, como ácaros, pelos de roedores e larvas de insetos (Figura 15). Durante a moagem, o transporte, a mistura ou o processamento da matéria-prima, os insetos são, geralmente, quebrados em pequenos fragmentos (VARGAS e ALMEIDA, 1996).

A presença de sujidades nos alimentos é um indicador de descuido com o controle higiênico sanitário durante o processamento e armazenamento do produto. Por esta razão a microscopia vem sendo adotada como prática corrente na avaliação da qualidade dos alimentos (SANTOS et al., 2000).

Figura 15 - Proliferação de larvas contaminando chocolates comerciais.

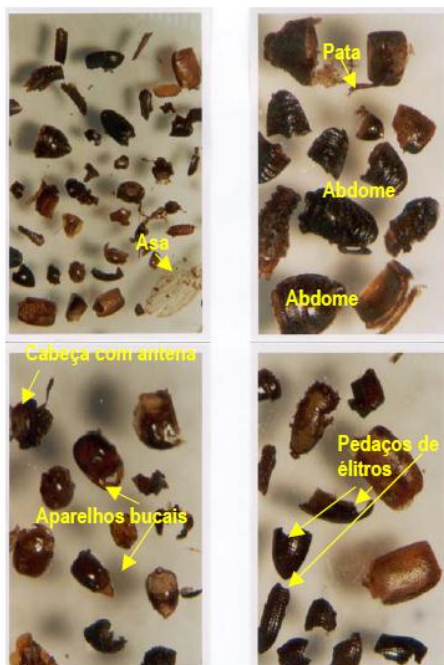


Fonte: Autor.

### 3.4.1 Insetos e ácaros

A presença de insetos em produtos industrializados pode indicar falha no processo de fabricação ou erros no armazenamento da matéria prima. Esta negligência pode levar determinados produtos a um nível de infestação consideravelmente perigoso à saúde humana, pois os insetos carregam em suas patas, aparelho bucal e nos excrementos agentes patogênicos, como bactérias, fungos e vírus (LORINI et al., 2002).

Figura 16 - Fragmentos de insetos (aumento 40 vezes).



Fonte: KREIBICH, 2014

Dois grandes grupos de insetos são representados: os pertencentes à Ordem Coleóptera (*pequenos besouros ou carunchos*), cujo corpo é revestido de um envoltório de quitina liso brilhante e rígido. Possui como característica, o primeiro par de asas duras, chamadas élitros, que servem de proteção ao abdômen e as asas posteriores. Esta estrutura não permite ao inseto vôos longos. Já o outro grupo é da Ordem Lepitoderal (*traças ou mariposas*), apresentando quatro asas membranosas recobertas de escamas coloridas que, ao menor contato, se desprendem. No estágio de lagartas são responsáveis pelos prejuízos, mas é na forma adulta que são mais fáceis de serem constatados. As traças são insetos que se alimentam de vegetais em decomposição. Algumas espécies domésticas se alimentam de cereais, massas, amidos e papel. A forma comum apresenta cerca de 1 mm de comprimento, não é parasita, e ocorre em lugares empoeirados com

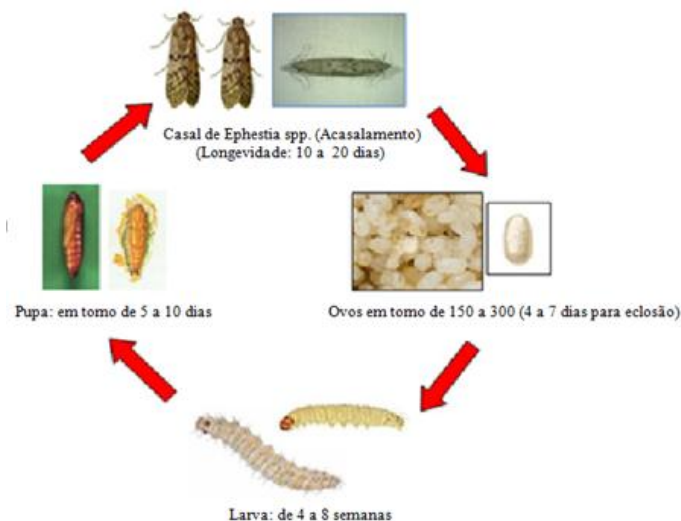
temperatura e umidade usualmente altas. Os adultos podem chegar a 19 mm de envergadura por aproximadamente 9 mm de comprimento apresentando coloração cinza nas asas anteriores e no corpo. São pragas que atacam grande número de produtos: amendoim, milho, trigo, arroz, farinha e biscoito (LORINI, 1998).

As traças de cereais são pequenas mariposas com 10 a 15 mm de comprimento. Apresentam asas anteriores de cor palha com franjas e asas posteriores claras, com franjas maiores. Os adultos vivem de 6 a 10 dias e voam bem. É uma praga de grande importância para o milho, seus derivados, farinhas e cereais. Assim como as borboletas, este inseto procura um meio para se reproduzir, e escolhe alimentos onde deposita seus ovos.

O ciclo biológico das traças do gênero *Ephestia spp* varia sempre de acordo com a disponibilidade de alimento, umidade e principalmente temperatura média (Figura 17). Em condições ideais o ciclo pode se completar entre 35 a 50 dias, dependendo da espécie. (LORINI, 1998).

Esses insetos são capazes de perfurar as embalagens de forma tão discreta que os furos não podem ser facilmente percebidos a olho nu, o que faz o consumidor pensar que elas já estavam dentro do produto quando foram fabricadas. É fato que as pragas de cereais (carunchos e traças) podem penetrar embalagens de produtos alimentícios, no entanto é possível ocorrer em pontos de venda, na própria residência do consumidor, além da fábrica. Em um produto com 3 meses de fabricação e com larvas vivas, a infestação pode ocorrer em fases posteriores, tais como transporte, estocagem e ponto de venda (SILVA JUNIOR, 1996).

Figura 17 - Ciclo Biológico de traças do gênero *Ephestia* encontradas em produtos de chocolate.



Fonte: SILVA JUNIOR, 1996

As condições de armazenamento também favorecem o desenvolvimento de ácaros, estando diretamente relacionadas, entre outros fatores, com o grau de limpeza dos depósitos, umidade relativa, temperatura e infestação de insetos (LORINI, 1998). O armazenamento torna-se inadequado com umidade relativa superior a 70%.

Os ácaros encontrados nos alimentos, considerados ácaros de armazenamento, são causadores de possíveis dermatites alérgicas. Os principais ácaros que constituem esse grupo são *Tyrophagus putrescentiae*, *Acarus siro* e *Lepidoglyphus destructor* (LORINI, 1998). Estes ácaros estão presentes nos produtos armazenados, especialmente nos alimentos com alto teor de gorduras e/ou proteínas. O alimento industrializado pode ser uma fonte veiculadora de ácaros, desencadeando reações alérgicas por contato, ingestão e inalação. O controle desses ácaros é dificultado, pelo fato de passarem despercebidos (tamanho reduzido). Porém, quando detectados, podem ser controlados através de alterações nas condições ambientais e estruturais de seu armazenamento (LORINI, 1998).

### 3.4.2 Fungos

Os fungos são seres vivos eucarióticos unicelulares como as leveduras, ou pluricelulares como os fungos filamentosos ou bolores e os cogumelos. (TRABULSI et al., 1999).

Os esporos dos fungos são abundantes e amplamente encontrados na natureza, germinam rapidamente no solo, em plantas, em alimentos, em papel e até em vidros. Os alimentos armazenados representam excelente campo para a proliferação dos fungos, principalmente quando os princípios básicos de secagem adequada e armazenamento correto são desconhecidos ou desprezados (FONSECA, 2014). Em condições favoráveis de temperatura e umidade, alguns fungos podem crescer em certos alimentos e produzir micotoxinas (FORTNUM, 1986; LILLEHOJ, 1986).

As espécies toxigênicas produzem micotoxinas através de seu metabolismo secundário. linhagens de fungos, tais como do gênero *Aspergillus*, por exemplo, podem produzir as aflatoxinas (AFLs). Segundo Heathcote (1984), as AFLs são metabólicos secundários, tóxicos, produzidos por *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus nomius*, e podem causar importantes danos aos seres humanos e animais, devido a sua alta toxicidade e ampla ocorrência, possuindo inclusive propriedades carcinogênicas, mutagênicas e teratogênicas. O gênero *Aspergillus* pertence ao grupo dos *Hyphomycetos* que se caracteriza pela formação de conidióforos, ou seja, hifas especializadas e produtoras de conídios com formas e arquitetura variáveis (PITT e HOCKING, 1997). Através de estudo de prevalência concluiu-se que a contaminação de grãos por fungos aflatoxigênicos como *A. flavus* é predominantemente sobre o *A. parasiticus* e sua produção é favorecida por temperaturas entre 23-26°C e umidade relativa do ar acima de 75%, sendo que a umidade relativa do ar acima de 85% e temperatura em torno de 27°C favorecem o crescimento e a produção de aflatoxinas (PEREIRA et al., 2002).

Os fungos crescem e se proliferam bem em cereais, principalmente, no amendoim, milho, trigo, cevada, sorgo e arroz, onde geralmente encontram um substrato altamente nutritivo para o seu desenvolvimento. O crescimento fúngico e produção de micotoxinas em cereais podem ocorrer em diversas fases do desenvolvimento, maturação, colheita, transporte, processamento ou armazenamento. Os fungos podem promover prejuízos significativos aos alimentos, podendo alterar as condições físicas dos produtos, reduzir o valor nutritivo, alterar o aspecto externo, produzir micotoxinas e favorecer a ação de

outros agentes de deterioração, como leveduras, bactérias e insetos (FONSECA, 2014).

Quando presentes em sementes ocasionam perda do poder germinativo, no arroz e na manteiga de cacau afetam a qualidade, promovendo descoloração, e no café produzem aromas desagradáveis.

Os fungos podem ser divididos em dois grupos: (a) fungos do campo, o dano causado antes da colheita, como *Cephalosporium*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Nigrospora*, *Helminthosporium*, *Alternaria* e *Cladosporium* e (b) fungos de armazenamento, o dano é causado se as condições de armazenagem forem impróprias, como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Mucor* (SCUSSEL, 2002). Os fungos do gênero *Aspergillus* (*A. halophilicus*, *A. restrictus*, *A. glaucus*, *A. candidus*, *A. alutaceus*, *A. ochraceus* e *A. flavus*) e os do gênero *Penicillium* (*P. viridicatum*, *P. verrucosum*) são os indicadores de deterioração em sementes e grãos, causando danos no germe, descoloração, alterações nutricionais nos alimentos, além de serem os principais produtores de micotoxinas (ATUI; LAZZARI, 1998).

A presença de *Aspergillus flavus* em alimentos pode ocasionar aspergilose, alergias e problemas respiratórios pelo contato e inalação de conídios (ATUI; LAZZARI, 1998). Algumas espécies do gênero *Penicillium* causam patogenias graves e destrutivas em frutos e cereais, crescendo com baixa presença de oxigênio, atividade de água mínima de 0.80. Vários são psicotróficos e capazes de causar deterioração alimentar em produtos mantidos sobre refrigeração (PITT; HOCKING, 1997).

Nem todos os fungos produzem toxinas. Por outro lado, a ausência de sinais visíveis de emboloramento também não pode ser interpretada como ausência de toxinas, pois as toxinas podem permanecer em um alimento mesmo depois que o fungo que a produziu tenha desaparecido do produto processado (SCUSSEL, 2002).

### 3.4.3 Aflatoxinas

O descobrimento das AFLs ocorreu durante o estudo das causas de um acidente econômico, em 1960, na Inglaterra, com a morte de 400.000 perus devido a uma doença chamada de Turkey X Disease, e que posteriormente foi associada ao consumo de ração contaminada (ZOLLNER, 2006). Em 1962 identificaram a ingestão do alimento contaminado com grande número de hifas de *Aspergillus flavus* como causa da doença, com um composto tóxico detectado por cromatografia em camada delgada (CCD), denominado de aflatoxina. Na detecção



foram observados compostos com fluorescência azul e verde, sob luz ultravioleta (UV), isto é, Aflatoxina B (Blue) e G (Green) e suas frações AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>, em que a AFB<sub>1</sub> é considerado o composto mais tóxico (SCUSSEL, 2002).

Duas outras micotoxinas são derivadas hidroxiladas resultantes do metabolismo das toxinas AFB<sub>1</sub> e AFB<sub>2</sub> são elas: aflatoxina M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) e M<sub>2</sub> (AFM<sub>2</sub>). Foram detectadas no leite e seus derivados, urina e fezes de mamíferos. A toxicidade da AFM<sub>1</sub> e AFM<sub>2</sub> é menor que da AFB<sub>1</sub>, porém a maior preocupação está no consumo dos alimentos contaminados pelas crianças (SCUSSEL, 2002; SILVA). A Figura 18 apresenta as estruturas químicas das principais aflatoxinas encontradas em alimentos.

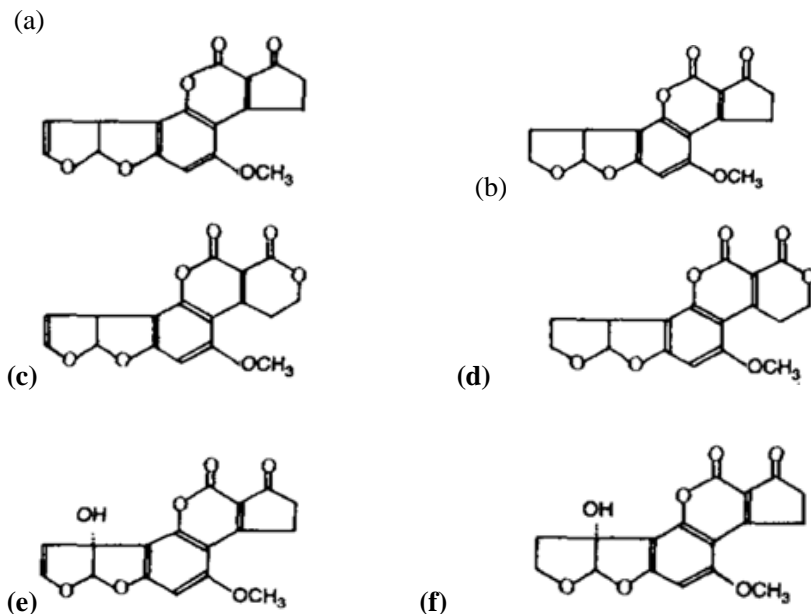
As AFLs contém intensa fluorescência quando expostas à luz ultravioleta (UV) com comprimento de onda longo (365 nm), facilitando a sua identificação e quantificação (Tabela 4) (PELLETIER; REIZNER, 1992). São substâncias apolares, solúveis em clorofórmio, metanol, benzeno e acetonitrila. Pequena ou nenhuma decomposição de AFLs é obtida sob cozimento, pasteurização e torrefação de alguns tipos de alimentos. Além disso, são incolores, inodoras e não alteram o sabor dos alimentos (PATERSON, 2010). Agentes oxidantes, como água oxigenada e hipoclorito de sódio, reduzem o teor de AFLs no alimento, mas a utilização de tais soluções é impraticável, uma vez que ocorre, além da destruição de nutrientes, e alterações no sabor, cor, textura e propriedades funcionais do alimento, a formação de resíduos tóxicos (PÁDUA; SILVEIRA; MARTINS, 2002).

Tabela 4 - Característica da fluorescência apresentadas pelas aflatoxinas em ordem decrescente de toxicidade, quando observadas sob luz UV à 365 nm

<b>Aflatoxinas</b>	<b>Fluorescência</b>
<b>AFB<sub>1</sub> e AFB<sub>2</sub></b>	Azul
<b>AFG<sub>1</sub></b>	Verde
<b>AFG<sub>2</sub></b>	Verde- azulada
<b>AFM<sub>1</sub></b>	Azul- violeta
<b>AFM<sub>2</sub></b>	Violeta

Fonte: SCUSSEL, 2002; JAY, 2005

Figura 18 - Estruturas químicas das principais aflatoxinas encontradas em alimentos: (a) AFB<sub>1</sub>, (b) AFB<sub>2</sub>, (c) AFG<sub>1</sub>, (d) AFG<sub>2</sub>, e em leite e produtos derivados (e) AFM<sub>1</sub> e (f) AFM<sub>2</sub>.



Fonte: WHO, 1998.

Há mais de 20 tipos de moléculas de AFLs e seus derivados isolados, porém os principais tipos estudados continuam sendo a AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub> (HUSSEIN e BRASEL, 2001), devido à elevada toxicidade (ROSA, 1995). As aflatoxinas presentes nos alimentos contaminados têm sido identificadas como fatores envolvidos na etiologia do câncer hepático no homem sendo a AFB<sub>1</sub> o composto com maior potencial toxigênico (hepatocarcinogênico) conhecido em mamíferos. A ingestão de alimentos com baixos teores de AFLs com uma dada frequência e por tempo prolongado determina aflatoxicose crônica (SCUSSEL, 2002), por outro lado a ingestão de alimentos com alto grau de contaminação em curto prazo, determina aflatoxicose aguda produz, efeitos agudos (HAAS, 2000). O efeito agudo de aflatoxicose em homens e animais é de manifestação e percepção rápidas, podendo levar à morte, pois causa alterações irreversíveis. A sua toxicidade depende da susceptibilidade da espécie animal, da idade,

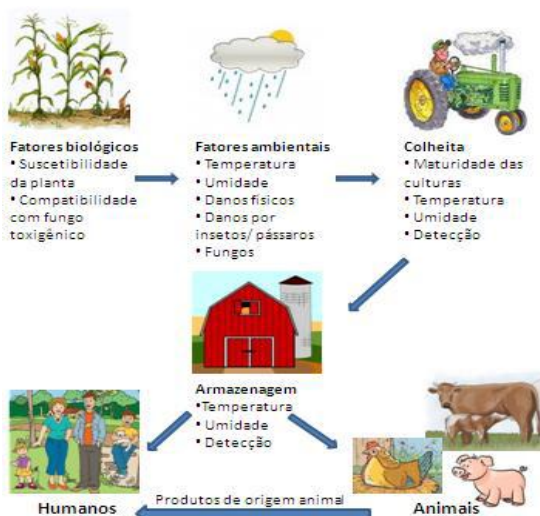
onde os mais jovens são mais afetados, do estado nutricional e do sexo. Pode provocar cirrose, necrose do fígado, proliferação dos canais biliares, síndrome de Reye (encefalopatia com degeneração gordurosa do cérebro), hemorragias nos rins e lesões na pele (TEIXEIRA, 2008).

### 3.5 FATORES QUE INTERFEREM NO DESENVOLVIMENTO DE CONTAMINANTES

Segundo Scussel (2002), os fatores que favorecem o desenvolvimento de fungos e produção de micotoxinas são classificados em três categorias: físicos, químicos e biológicos, sendo que estes estão relacionados às condições do próprio grão (fatores internos) e do ambiente (fatores externos) que o envolve. Os mais importantes compreendem: conteúdo de umidade, temperatura, linhagem do fungo contaminante e competição microbiana. Também o período de armazenagem, impurezas (restos da planta, poeira, casca e pedaços de grãos), insetos e ácaros (danos), condições dos grãos (grãos com danos mecânicos e/ou visualmente alterados), fungicidas, composição do substrato, variedades resistentes e o grau de contaminação podem interferir na proliferação de fungos e na formação das micotoxinas.

As matérias estranhas e/ou impurezas presentes tanto nos lotes de grãos quanto na poeira que envolve o ambiente de armazenagem, podem ser responsáveis por deterioração de lotes inteiros já que esta mistura favorece a proliferação de fungos e toxinas. Já os danos mecânicos ou biológicos provenientes do ataque de insetos e roedores nos grãos favorecem a absorção de umidade e facilitam a invasão e a penetração de fungos no interior altamente nutritivo desses substratos, levando ao rápido desenvolvimento dos fungos e, consequentemente, ao aumento da produção de micotoxinas. O desenvolvimento de fungos também depende da composição atmosférica gasosa do ambiente em que os grãos estão inseridos, sendo que podem crescer em baixas concentrações de oxigênio ( $O_2$ ), sendo afetados somente a concentrações inferiores a 0,2%; portanto, misturas de gases podem ser usadas para reduzir a concentração de  $O_2$  (SCUSSEL, 2002). A Figura 21 esquematiza os fatores que interferem na ocorrência de micotoxinas na cadeia alimentar, segundo Paterson e Lima (2010).

Figura 19 - Fatores que interferem na ocorrência de micotoxinas na cadeia alimentar



Fonte: PATERSON; LIMA, 2010

### 3.5.1 Fatores externos

As condições de armazenamento podem favorecer o desenvolvimento de ácaros, insetos e microrganismos (estando diretamente relacionadas com o grau de limpeza dos depósitos) e temperatura do ambiente (LORINI, 1998). As micotoxinas são formadas quando a temperatura e umidade, além das características bioquímicas dos produtos que servem como substrato, são propícias para a sua produção. O crescimento de fungos aflatoxigênicos (*Aspergillus*) é favorecido por temperaturas entre 23-26 °C e UR acima de 75%, enquanto que para a produção de AFLs, a temperatura e UR ideal é acima de 27 °C e 85%, respectivamente (PRADO, 1993).

### 3.5.2 Fatores internos

*Teor de umidade:* A umidade da matéria prima utilizada no preparo do chocolate tem relação direta com a presença de contaminantes microbiológicos (fungos e bactérias) e desenvolvimento de toxinas biológicas, especialmente as micotoxinas (SCUSSEL, 2000;

2002). Quanto mais alto o teor de umidade, maior o aparecimento de fungos, tanto nos grãos como nos alimentos processados.

*Atividade de água (aw):* A melhor medida de concentração da água no produto final refere-se à medição de sua *aw* (teor de água livre no produto) (Tabela 5). É responsável pela deterioração do produto, favorecendo o crescimento microbiológico. Em geral, o crescimento de bactérias patogênicas em alimentos ocorre numa faixa de *aw* de 0,90 a 0,86 e o crescimento fúngico ocorre numa faixa mais ampla, variando de 1,0 a 0,80 (NORTHOLD et al, 1979).

*Composição do substrato:* As características físicas e químicas do substrato são importantes na determinação na variabilidade de contaminantes prováveis de serem encontrados. Os parâmetros físicos incluem disponibilidade de oxigênio e de ar residual no produto. Entre as características químicas, destacam-se os conteúdos de proteínas, gorduras, aminoácidos e minerais. Também são referenciados por Komprda et al. (2004) outros parâmetros, tais como pH e adição de aditivos, podendo desencadear mecanismos favoráveis para a formação de micotoxinas.

Tabela 5 - Atividade de água mínima para crescimento de fungos toxigênicos e produção de toxinas

Microrganismo	Aw mínima	
	Crescimento	Produção de toxina
<i>Aspergillus clavatus</i>	0.85	0.99 (patulina)
<i>A. flavus</i>	0.78	0.83 – 0.87 (aflatoxina)
<i>A. ochraceus</i>	0.83	0.85 (ocratoxina)
<i>A. parasiticus</i>	0.82	0.87 (aflatoxina)
<i>Penicillium cyclopium</i>	0.81	0.87 – 0.90 (ocratoxina)
<i>P. patulum</i>	0.83 – 0.85	0.95 (patulina)
<i>P. viridicatum</i>	0.83	0,83 – 0.86 (ocratoxina)

Fonte: SCUSSEL, 2002.

### 3.6 LEGISLAÇÃO

A Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, considerando a necessidade do constante aperfeiçoamento das ações de controle sanitário na área de alimentos visando proteção à saúde da população e a necessidade do constante aperfeiçoamento das ações de controle sanitário na área de alimentos, aprovou o Regulamento

Técnico; "Condições Higiênicas Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores / Industrializadores de Alimentos", conforme BPF: Portaria 326 SUS/MS 1997.

Resolução RDC Nº 14/2014, publicada em 31/03/2014, define limites de tolerância para matérias estranhas em alimentos e bebidas. A nova norma define dois tipos de matérias estranhas, as que indicam risco à saúde e as que não apresentam riscos, mas demonstram falhas no processo de produção, manipulação ou armazenamento. Todos os limites estabelecidos referem-se a fragmentos microscópicos que podem estar presente no processo de produção do alimento, mas que não podem ser totalmente eliminados mesmo com a adoção das boas práticas (Tabela 6).

Tabela 6 - Limites de tolerância para matérias estranhas, exceto ácaros, em cacau e produtos de chocolates

<b>Grupos de alimentos</b>	<b>Alimento</b>	<b>Matérias estranhas</b>	<b>Limites de Tolerância (máximos)</b>	<b>Metodologia Analítica AOAC</b>
Cacau e produtos derivados	Cacau e pasta de cacau	Fragmentos de insetos indicativos de falhas das boas práticas (não considerados indicativos de risco)	25 em 50g	965.38 a (16.02.01)
	Chocolate e produtos de chocolates	Fragmentos de pelos de roedor	1 em 50g	965.38 a (16.02.01)
		Fragmentos de insetos indicativos de falhas das boas práticas (não considerados indicativos de risco)	10 em 100g	965.38 b (16.02.01)
		Fragmentos de pelos de roedor	1 em 100g	965.38 a (16.02.01)

Fonte: ANVISA, 2014

### 3.6.1 Micotoxinas (Aflatoxinas)

#### a) Legislação Nacional

Para minimizar a alta incidência da contaminação de micotoxinas, legislações têm sido adotadas em muitos países para regulamentar os níveis máximos permitidos nos alimentos. Aproximadamente 99 países possuem legislação para a presença de aflatoxinas em alimentos e rações, o que representa 87% da população mundial (SCUSSEL; BEBER; SOUZA, 2010).

No Brasil, os limites para micotoxinas eram estabelecidos somente para AFLs por meio da Resolução N° 34/76 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos, a qual estabelecia o limite aceitável de 30 µg/kg de AFLs para alimentos em geral. Em 2002, por meio da Resolução N° 274/2002 da ANVISA este limite passou para 20 µg/kg. Contudo, em fevereiro de 2011 entrou em vigor uma nova Resolução (RDC N° 07, de 18 de Fevereiro de 2011) desenvolvida pela ANVISA que apresentou limites de aplicações imediatas para AFLs em amêndoas de cacau, produtos de cacau e chocolate (BRASIL, 2011) (Tabela 7).

Tabela 7 - Limites Máximos Tolerados (LMT) de aflatoxinas em amêndoas de cacau e produtos de cacau e chocolate

Micotoxinas	Alimento	LMT (µg/kg)
<b>Aflatoxinas 1, B2, G1, G2</b>	Amêndoas de cacau	10
	Produtos de cacau e chocolate	5

Fonte: BRASIL, 2011

#### b) Legislação Internacional

Conforme o Comitê Científico de Alimentação, a CE (Comunidade Européia) adotou o regulamento da comissão 1525/98 reduzindo os Limites Máximos de Resíduo (LMR) para as AFLs em alimentos. Devido a potenciais riscos para os seres humanos, níveis regulamentares foram recentemente atualizados para AFB1 e aflatoxinas totais, estabelecendo o LMR, baseado no REGULAMENTO (CE) 1881/2006 (CEE, 2006). Frutos de casca rija submetidos a um método de triagem ou a outro tratamento físico antes do consumo humano ou utilização como ingredientes de gêneros alimentícios possui LMT de 10



µg/kg para Aflatoxinas B1, B2, G1, G2. Frutos secos e produtos derivados da sua transformação, destinados ao consumo humano directo ou como ingredientes de género alimentício possui LMR de 4 µg/kg para Aflatoxinas B1, B2, G1, G2. Café verde, frutos secos (exceto uva passa), cerveja, cacau e produtos derivados do cacau, vinhos licorosos, não apresentam LMR para aflatoxinas e ocratoxinas.

Como ainda não há harmonização dos limites de AFLs em cacau para todos os países importadores, na Tabela 8, estão citados os limites máximos permitidos utilizados em alguns países para AFLs em alimentos em geral.

Tabela 8- Limites máximos permitidos para aflatoxinas em alimentos em diversos países

PAÍS	LIMITE MÁXIMO (µg/kg)	ALIMENTOS
Austrália	5 (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2)	Nozes e seus produtos
Canadá	15(AFB1+AFB2+AFG1+AFG2)	Todos os alimentos
Estados Unidos	20 (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2)	Todos os alimentos
Japão	10 (AFB1)	Amendoim
União Européia	2 (AFB1) 4(AFB1+AFB2+AFG1+AFG2)	Nozes e frutas secas
Argentina	20 (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2) 5 (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2) 30 (AFB1)	Derivados de amendoim Milho Farinha de soja
Brasil	20 (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2)	Pasta de amendoim, Farinha de milho, Milho(integral/quebrado /moído)

Fonte: PACHECO; SCUSSEL (2006)

### 3.7 PROCESSOS DE DESCONTAMINAÇÃO DE SUJIDADES, FUNGOS E MICOTOXINAS

Os desafios mais comuns na indústria de produtos de chocolate incluem o processamento do cacau, pasta de cacau, os erros de amostragem, métodos analíticos, interações sinérgicas, condições de armazenamento e contaminação com sujidades, fungos e micotoxinas. Os subprodutos do chocolate, como pasta de cacau, manteiga de cacau, além do açúcar, leite e outros produtos de origem vegetal que são incluídos frequentemente na formulação de chocolates, podem conter

níveis concentrados de contaminantes. Desta forma, pesquisadores têm estudado exaustivamente ações preventivas e métodos para descontaminação do cacau, pasta do cacau e produtos de chocolate.

As micotoxinas são compostos químicos e termicamente estáveis. Portanto, uma vez que um ingrediente contaminado por uma micotoxina é selecionado e incorporado no processo de trituração, as micotoxinas poderão ser retidas no produto acabado, e será impossível a sua remoção. As estratégias de detoxificação devem objetivar a remoção de contaminantes, sem comprometer a qualidade nutritiva do alimento (LEUG et al., 2006).

Conforme Trenholm (2000), os métodos de descontaminação podem ser classificados em três categorias: físicos, químicos e biológicos.

Os *métodos físicos* envolvem técnicas de processamento como o peneiramento e a lavagem. São métodos utilizados para as sementes, grãos e amêndoas do cacau. As amêndoas rachadas, danificadas e imprópriamente desenvolvidas são atraentes para fungos produtores de toxinas, logo a separação destas frações mais contaminadas pode reduzir os níveis de micotoxinas. Os métodos de lavagem aproveitam-se do fato de que as micotoxinas são encontradas na superfície exterior dos grãos, porém a principal desvantagem deste método é que os cereais molhados necessitam de secagem, necessitando de um custo extra. Além do uso destas técnicas de processamento, o beneficiamento dos grãos deve ser manuseado com cuidado a fim de impedir danos às amêndoas, a pasta de cacau e seu chocolate, minimizando deste modo a formação de contaminantes.

Os *métodos químicos* referem-se à adição de substâncias químicas que ao entrarem em contato com a micotoxina proporcionam uma mudança na conformação da molécula ou em sua ligação. Podem ser realizados por tratamento com atmosfera modificada (ozônio –  $O_3$ , nitrogênio –  $N_2$ , gás carbônico –  $CO_2$ ) e por meio de produtos químicos. Estes métodos são bastante utilizados na indústria de alimentos por apresentarem rapidez e baixo custo. Os inibidores de fungos são baseados em ácidos (ácido benzoico, acético, sórbico e propiônico). Possuem a função de destruir as membranas celulares e acidificar o conteúdo citoplasmático das células fúngicas (LAMBERT, 1999).

Os *métodos biológicos* de desativação de micotoxinas são pelo uso de microrganismos capazes de transformar micotoxinas em metabólicos atóxicos na alimentação animal, impedindo as micotoxicoses (SCHATZMAYR et al., 2006). Estudos enfatizam que as

pesquisas ainda estão limitadas para comprovar a sua eficiência e praticabilidade.

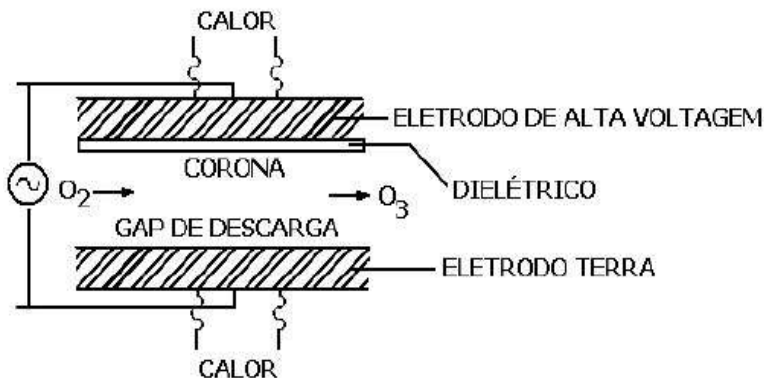
### **3.7.1 Gás ozônio como método de conservação e detoxificação**

Novos regulamentos e legislações alimentares vêm limitando o uso de fumigantes empregados em alimentos devido aos resíduos persistentes porque podem causar toxicidade e prejuízos ao meio ambiente. Por estas razões, o interesse em outros métodos mais eficazes e funcionais que possam reduzir a contaminação biológica é uma alternativa a ser levada em consideração para o uso em alimentos. O ozônio ( $O_3$ ) tem sido usado para controlar o crescimento de fungos e reduzir a contaminação de micotoxinas em grãos e cereais com diversas vantagens sobre os métodos tradicionais (KELLS et al., 2001; TIWARI et al., 2010). Por ser um gás oxidante, tem inúmeras aplicações na indústria alimentícia pelas vantagens que apresenta nas técnicas de preservação (GUZEL-SEYDIM; GREENE; SEYDIM, 2004).

O ozônio é um alótropo triatômico ( $O_3$ ) composto por três átomos de oxigênio que se formam quando as moléculas de oxigênio se rompem devido à radiação ultravioleta e os átomos separados combinam-se individualmente com outras moléculas de oxigênio (CULLEN et al., 2009). Devido a maior estabilidade do oxigênio, a molécula de  $O_3$  sofre um processo de dissociação espontânea com o tempo resultando novamente na formação do oxigênio (LANGLAIS, 1991). A decomposição não resulta em espécies nocivas já que o mesmo é espontaneamente convertido em  $O_2$ . Por ser instável, requer que ele seja produzido no seu local de aplicação reduzindo assim gastos e perigos relacionados como seu transporte e estocagem (ARMOR, 1999; TATAPUDI; FENTON, 1994).

A produção comercial do ozônio é realizada pelo processo corona de descarga elétrica (USEPA, 1999), constituído por dois eletrodos que são submetidos a uma elevada diferença de potencial. O  $O_3$  é gerado pela passagem de ar ou oxigênio puro entre os dois eletrodos (Figura 20). Quando os elétrons possuem energia suficiente para dissociar a molécula de  $O_2$ , começam a ocorrer colisões, que causam a dissociação do  $O_2$  e a consequente formação do  $O_3$  (CULLEN et al., 2009; USEPA, 1999).

Figura 20 - Sistema tipo descarga corona de geração de ozônio



FONTE: adaptado de Usepa, 1999

### 3.7.2 Efeito oxidativo sobre fungos e micotoxinas

O ozônio corresponde ao segundo agente oxidante comum mais potente. É reconhecido desde 1997 como uma substância GRAS (geralmente reconhecida como segura) e usado em um número de aplicações na indústria de alimentos como descontaminante. Esta potente capacidade de oxidação o torna muito eficaz na destruição de microrganismos, incluindo bactérias (KIM; YOUSEF, 2000; SHARMA et al., 2002; XU, 1999), fungos (PEREZ et al., 1999; PALOU et al., 2002; SCUSSEL et al., 2011; GIORDANO et al., 2012; SAVI et al., 2015a), vírus e protozoários (CULLEN et al., 2009; KHADRE; YOUSEF; KIM, 2001; RESTAINO et al., 1995) e por reagir frente a diversos constituintes celulares, possui reduzida chance de desenvolvimento de resistência frente aos organismos alvo (Tabela 9) (GUZEL-SEYDIM, GREENE, SEYDIM, 2004; GRAHAM et al., 2011). Além disso, também tem potencial para matar pragas de armazenagem (KELLS et al., 2001; MENDEZ et al., 2003), degradar micotoxinas (YESILCIMEN; OZDEMIR, 2006; INAN et al., 2007; CULLEN et al., 2009; SAVI et al., 2015a; SAVI et al., 2015b), agrotóxicos e resíduos químicos (ONG et al., 1996; HWANG; CASH; ZABIK, 2001; SAVI et al., 2015b).

Tabela 9 - Agentes oxidantes de seus respectivos potenciais oxidativos

<b>Agente oxidante</b>	<b>Potencial oxidativo (mV)</b>
Flúor	3,06
Ozônio	2,07
Permanganato	1,67
Dióxido de cloro	1,50
Ácido hipocloroso	1,49
Gás cloro	1,36

mV: milivolts

FONTE: Guzel-Seydim; Greene; Seydim, 2004.

O gás  $O_3$  apresenta certas características sanitizantes de interesse para a indústria alimentícia, por ser mais seguro e potente do que os desinfetantes convencionais e agir sobre um grande número de microrganismos, incluindo patógenos resistentes (GRAHAM et al., 2011). É usado para controlar o crescimento de fungos, reduzir a contaminação por micotoxinas, remover resíduos de pesticidas (ONG et al., 1996; SAVI et al., 2015b) e estender a vida pós-colheita dos alimentos sem reduzir o seu valor nutricional (MENDEZ et al., 2002; TIWARI et al., 2010; WHITE et al., 2010; MCDONOUGH et al., 2011; SCUSSEL et al., 2011; GIORDANO et al., 2012; SAVI et al., 2015a).

### 3.7.3 Aplicação de ozônio em alimentos in natura e processados

O  $O_3$  foi aprovado para utilização em BPF, que significa "a exposição dos alimentos ao ozônio (concentração e do tempo de exposição) para realizar a sua finalidade".

Muitos estudos têm sido relatados sobre o efeito do  $O_3$  que tem reduzido o nível de AFL em produtos agrícolas contaminados. MAEBA et al., (1988) tem confirmado a destruição e descontaminação de AFB1 e AFG1 com  $O_3$ . AFB1 e AFG1 são sensíveis ao  $O_3$  e degrada com 1,1mg/L em 5 minutos em modelo experimental. O efeito bactericida do  $O_3$  tem sido estudado e documentado por uma variedade de organismos, incluindo as bactérias Gram positiva e Gram negativa bem como os esporos e células vegetativas (RESTAINO et al., 1995). Estudos de Giordano et al.(2012) e Scussel et al. (2012) tem mostrado redução total da contagem de fungos após tratamento com ozônio em 31 ppm (30 min) e 10 ppm (90 min), respectivamente. O mesmo ocorreu na descontaminação das aflatoxinas, onde houve redução total nas concentrações de ozônio aplicadas. Em grãos de trigo, Savi et al.

(2015a) também encontrou resultados significativos de descontaminação por ozônio gasoso. O crescimento de *A. flavus* foi reduzido significativamente ( $8.5 \times 10^1$  e  $5.35 \times 10^1$  UFC/g) após 30 min de exposição com gás ozônio em concentrações de 40 e 60  $\mu\text{mol/mol}$  quando comparado ao grupo controle ( $44 \times 10^1$  UFC/g), o que representa 80.7 a 87.8% de inibição de esporos. Entretanto, somente a exposição de ozônio a 60  $\mu\text{mol/mol}$  inibiu totalmente o crescimento de *A. flavus* após 180 min. Nesta mesma concentração e tempo de exposição, o gás ozônio reduziu para 12.51, 41.06, 47.96 e 37.81  $\mu\text{g/Kg}$  as AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>, quando comparadas com o grupo de controle (231.88, 265.79, 239.92 e 199.44  $\mu\text{g/Kg}$ ), o que representa uma redução de 94.6, 84.5, 80.0 e 81.0%, respectivamente.

A utilização de O<sub>3</sub> torna-se atraente pelo fato de descartar a necessidade de manipulação, armazenamento e eliminação dos recipientes de produtos químicos e, principalmente, por não deixar resíduos tóxicos, uma vez que o único produto da sua degradação é o oxigênio (O<sub>2</sub>).

Estudos realizados por vários autores também demonstram a viabilidade econômica do uso do ozônio para fumigar cereais armazenados, corroborando o uso de ozônio como fumigante de grãos de uma alternativa viável de ambas as perspectivas ambientais e econômicas (TIWARI et al., 2010).

Reduções tão altas quanto  $10^3$  UFC/g de microrganismos associados a grãos armazenados foram alcançadas com os tratamentos de O<sub>3</sub>, bem como reduções significativas nos níveis de micotoxinas. Além disso, as investigações em grãos tratados com O<sub>3</sub> indicam que este não tem impacto sobre a qualidade intrínseca do grão (MCDONOUGH et al., 2011).

Savi et al. (2014) mostraram que o gás ozônio não alterou características físico-químicas em concentrações e tempos de exposição eficientes frente aos contaminantes (fungos e micotoxinas) em grãos de trigo. Dentre elas, foram avaliadas a oxidação do amido, peroxidação lipídica, análise de proteínas, alterações morfológicas e germinação. Em adição, Scussel et al. (2011) tem encontrado resultados similares com castanhas-do-Brasil que possui alto teor de lipídios (60 a 70%), os quais não apresentaram oxidação lipídica após o tratamento com ozônio a 10ppm por 90 min de exposição.

Tabela 10 - Aplicação de ozônio (O<sub>3</sub>) gasoso em diferentes concentrações e tempos de exposição em alimentos reportados na literatura

OZÔNIO				
Matriz	Concentração	Tempo de exposição	Reduções Observadas	Referências
CEREAIS				
Trigo	0,33 mg/g por min	5 min	96 % esporos de fungos	Wu et al. (2006); Tiwari et al. (2010)
Cevada	0,16 mg/g	5 min	96 % esporos de fungos	Allen et al. (2003); Tiwari et al. (2010)
Milho	50 ppm = mg/L	3 dias	63 % <i>Aspergillus</i>	Kells et al. (2001)
Milho	200 mg/min	92 horas	>95 % AFB1	McKenzie et al. (1998); Zorlugenic et al (2008).
Castanha-do-Brasil	31 ppm	300 min	100% contagem total	Giordano et al., 2012
Castanha-do-Brasil	10 ppm	90 min	100% contagem total	Scussel et al., 2011
Trigo	40 µmol/mol	30 min	80.7% <i>A. flavus</i>	Savi et al., 2015a
	60 µmol/mol	30 min	87.8% <i>A. flavus</i>	Savi et al., 2015a
	60 µmol/mol	180 min	100% <i>A. flavus</i>	Savi et al., 2015a
OUTROS				
Figo desidratado	13,8 mg/L	15 min	100 % fungos	Zorlugenic et al (2008).

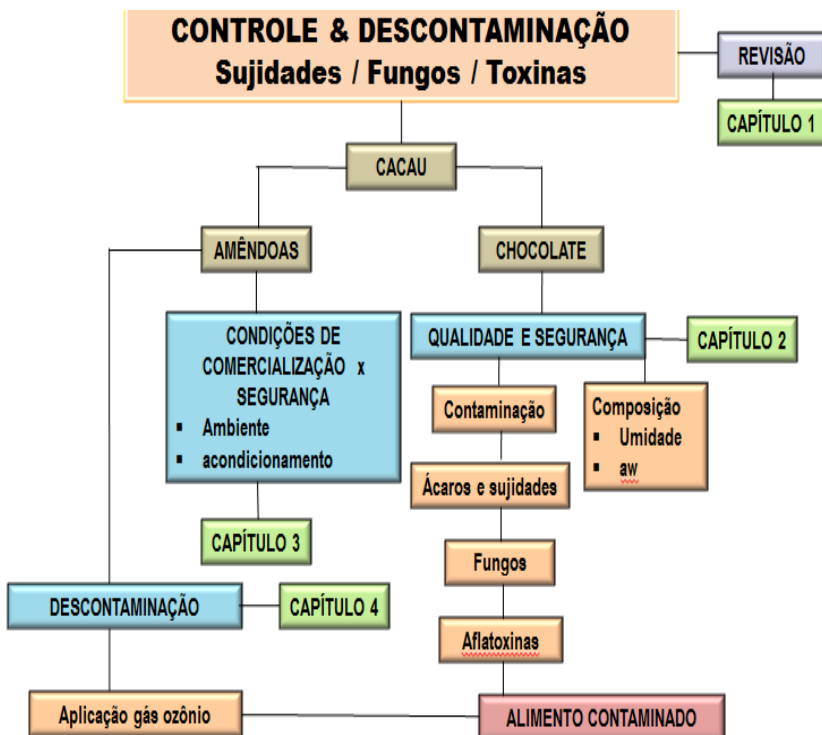
Figo desidratado	13.8 mg/L	30, 60, 180 min	48,7; 72, 4 e 95, 2 % AFB1	Zorlugenic et al (2008).
Castanha-do-Brasil	31 ppm	300 min	100% AFLs	Giordano et al., 2010
Castanha-do-Brasil	10 ppm	90 min	100% AFLs	Seussel et al., 2011
Trigo	40 µmol/mol	30 min	46.8% AFB <sub>1</sub> 74.3% AFB <sub>2</sub>	Savi et al., 2015a
	60 µmol/mol	30 min	52.7% AFB <sub>1</sub> 77.5% AFB <sub>2</sub>	Savi et al., 2015a
			94.6% AFB1	
			84.5% AFB <sub>2</sub>	
	60 µmol/mol	180 min	80.0% AFG <sub>1</sub>	Savi et al., 2015a
			81.0% AFG <sub>2</sub>	

Fonte: AUTOR.



A Figura 21 apresenta o fluxograma geral de todo o estudo.

Figura 21 – Fluxograma geral de todo o estudo de controle e descontaminação de amêndoas de cacau (*Theobroma cacao* L.) e seus produtos



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABICAB. 2014. Associação Brasileira da Indústria de Chocolate, Cacau, Balas e Derivados. Disponível em: <http://www.abicab.org.br>. Acesso: 11/05/ 2014.

AFOAKWA, E. O., PATERSON, A., FOWLER, M. *Factors influencing rheological and textural qualities in chocolate – a review. Trends in Food Science & Technology*, v. 18, p. 290–298, 2007.

ALVES, A. B.; BRAGAGNOLO, N. Determinação simultânea de teobromina, teofilina e cafeína em chás por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 2, 2002.

ANDRADE, Nélio José de; MACEDO, Jorge Antonio B. de. Higienização na indústria de alimentos. xiv, 182p, il. BECKETT, S. T. **Fabricacion y utilizacion industrial del chocolate**. Zaragoza; cr: ia, 1994. 432p, il. Tradução de Industrial chocolate manufacture and use. São Paulo: Varela, 1996

ARCE, M.A.B.R. **Pós colheita e armazenagem de grãos**. Departamento Agroindústria, Alimentos e Nutrição – São Paulo: ESALQ/USP, 2004.

ARMOR, J.N. Striving for catalytically green processes in the 21st century. **Applied Catalysis A: General**, v. 189, n.2, p. 153-162, 1999.

ATUI, M. B.; LAZZARI, F. A. Monitoramento de fungos em milho em grão, grits e fubá. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 4, p. 363-367, 1998.

BASTOS, C. P. **Processamento de Chocolate**. Trabalho (apresentado como requisito parcial da disciplina de Seminários) – Bacharelado em Química de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas 2003.

BATALHA, P. G. **Caracterização do cacau catongo de São Tomé e Príncipe**. Mestrado (Mestre em Engenharia de Alimentos – Tecnologia de Produtos vegetais) Universidade Técnica de Lisboa. Instituto Superior de Agronomia. Lisboa – Portugal, 2009.

BAUDET, L. Armazenamento de sementes. In: PESKE, S.T.; ROSENTHAL, M. D.; ROTA, G.R.M. **Sementes: fundamentos científicos e tecnológicos**. Pelotas: UFPel Editora e gráfica universitária, 414 p, 2003.

BEAUCHAT, L.R. Microbial stability as effected by water activity. **Cereal Food World**, n. 26, p.345-349, 1981.

BECKETT, S. T. **Industrial Chocolate Manufacture and Use**. Fourth Edition. York: Wiley-Blackwell, 1994.

BORCHERS, A. T.; KEEN, C. L.; HANNUM, S. M.; GERSHWIN, M. E. Cocoa and Chocolate: Composition, Bioavailability, and Health Implications. **Journal of Medicinal Food**, v. 3, n. 2, 2000.

BRACKMANN, A.; NEUWALD, D.A.; RIBEIRO, N.D.; DE FREITAS, S.T. Conservation of three bean genotypes (*Phaseolus vulgaris* L.) of the group carioca in cold storage and controlled atmosphere. **Ciência Rural**, v. 32, n. 6, 2002.

BRAGANTINI, C. **Alguns Aspectos do Armazenamento de Sementes e Grãos de Feijão**. Embrapa Arroz e Feijão. ISSN 1678-9644, 28p, Dezembro, 2005.

BRAMORSKI, A; VASCONCELLOS S. K. Avaliação do equipamentos de refrigeração e congelamento dos maiores supermercados do município de Blumenau, SC. **Revista Higiene Alimentar**, Santa Catarina, v.19 n.133, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n.264, de 22 de setembro de 2005. **Aprova Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Chocolate e Chocolate Branco**. Disponível em <<http://legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=18823&word=chocolate>> Acesso em: 10 jan. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. **Resolução RDC n.265, de 22 de setembro de 2005. Aprova Regulamento Técnico para balas, bombons e gomas de mascar**. Disponível em: <

[legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=18824](http://legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=18824)>. Acesso em: 10 jan. 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. **Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos**. Resolução - RDC nº 7, fevereiro de 2011. Disponível em: <<http://www.brasilsus.com.br/legislacoes/anvisa/107378-7.html>>. Acesso em: 04 abr. 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Dispõe sobre matérias estranhas macroscópicas e microscópicas em alimentos e bebidas, seus limites de tolerância e dá outras providências. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 14, de 28 de março de 2014**. Disponível em: [portal.anvisa.gov.br/...](http://portal.anvisa.gov.br/...)\_Acesso em: 04 abr. 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. **Prorrogação para 1º de janeiro de 2017 o prazo para adequação estabelecidos nos artigos 11 e 12 e respectivos anexos III e IV da Resolução - RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011, que dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos**. Resolução nº 59 publicada em 30/12/2013. 2013a. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/40fd6c004337b6ccaf51af1e82c52611/>>. Acesso em: 10 fev. 2015.

BROOKER, D.B., BAKKER-ARKEMA, F.W., HALL, C.W. Drying and storage of grains and oilseeds. New York: **Van Nostrand Reinhold**, 1992. 450p.

CEPLAC (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira). Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Indicação de variedades de cacau para cultivo comercial – Rede de avaliação de clones em larga escala**. Material cedido pela CEPLAC, 2014.

CIOLA, R. **Fundamentos da cromatografia líquida de alto desempenho: HPLC**. São Paulo: Edgard Blucher, 1998. 179 p.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Boletim técnico, **Subsídios para as operações de castanha do Brasil no programa de aquisição de alimentos**. Disponível: <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/sureg/pa/subs>

ideos\_para\_operacoes\_de\_castanha\_do\_para.pdf, Acesso em: 10 fev. 2015.

CULLEN, P. J. et al. Modelling approaches to ozone processing of liquid foods. **Trends in Food Science and Technology**, v. 20, n.3-4, p. 125-136, 2009.

DEGANI,A.L.G., CASS,Q.B., VIEIRA,P.C. **Cromatografia: um breve ensaio.** [S.I]: Química Nova na Escola, 1998. Disponível em: <http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc07/atual.pdf>. Acesso em:13 de fevereiro de 2014.

EFRAIM, P. **Contribuição à melhoria de qualidade de produtos de cacau no Brasil, através da caracterização de derivados de cultivares resistentes à vassoura-de-bruxa e de sementes danificadas pelo fungo.** Campinas, 2009. Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2009.

ELWERS, S.; ZAMBRANO, A.; ROHSIUS, C.; LIEBEREI, R. Differences between the content of phenolic compounds in Criollo, Forastero and Trinitario cocoa seed (*Theobroma cacao* L.). **European Food Research and Technology**, v. 229, p., 2009.

FALEIRO F. G.; NIELLA G. R.; CERQUEIRA, A. R. R.N.; DAMACENO V. O.; GOMES L. M.C.; FALEIRO A. S.G. Produção de Micélio de *Crinipellis pernicioso* em Quatro Meios de Cultura, Visando Extração de DNA. **Revista Fitopatologia Brasileira**, n. 29, 2004.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations.**Food Outlook – Global Market Analysis**, Wheat, 1997.Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 05/05/2014.

FIREMAN, A. Micotoxinas – A Importância do gerenciamento, dos métodos diagnósticos corretos e da escolha do produto certo para evitar seus efeitos deletérios sobre a produção animal. **Produção animal – Avicultura**, 2007.

FONSECA, H. **Os fungos e a deterioração de alimentos.** Disponível: <<http://www.micotoxinas.com.br/boletim4.htm>> Acesso em 5 de março 2014.

FORTNUM, B.A. Effect of environment on aflatoxin development in pre-harvest maize: I: Workshop on Aflatoxin in Maize, El Batán, 1986. **Proceedings**. El Batán: CIMMYT, p.145-51, 1986.

FRANCO, A. **De caçador a Gourmet – Uma história da Gastronomia**. Editora Senac. 3ª edição – São Paulo- 2001.

GIORDANO, B.N.E., NONES, J., SCUSSEL, V.M. Susceptibility of the in-shell Brazil nut mycoflora and aflatoxin contamination to ozone gas treatment during storage. **J. Agric. Sci.** 4 (8):1-10, 2012.

GRAHAM, T.; ZHANG, P.; WOYZBUN, E.; DIXON, M. Response of hydroponic tomato to daily applications of aqueous ozone via drip irrigation. **Scientia Horticulturae**, v. 129, p. 464–471, 2011.

GUZEL-SEYDIM, Z. B.; GREENE, A. K.; SEYDIM, A. C. Use of ozone in the food industry. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, San Diego, v. 37, n.4, p. 453-460, 2004.

HAAS, P. **Exposição da população a aflatoxina B1 e ocorrência de carcinoma hepatocelular nos estados de São Paulo e Santa Catarina**. 2000. 96p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000.

HALL, C.W. **Drying and storage of agricultural crops**. Westport, The AVI publishing Company, INC, 381 p.1980.

HEATHCOTE, J.G. **Aflatoxins and related toxins**. In: Betina, V. (Ed) **Micotoxins –Production, isolation, separation and purification**. Amsterdam: Elsevier, p. 89-130, 1984.

HERME, Pierre. **Larousse do Chocolate**. Editora Larousse. 1ª edição – São Paulo-2006.

HWANG, E.; CASH, J. N.; ZABIK, M. J. Postharvest treatments for the reduction of Mancozeb in fresh apples. **Journal Agriculture Food Chemistry**. 49, 3127-3132, 2001.

HUSSEIN S.; BRASEL J.M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, n.2, p.101-134, 2001.

HWANG, E.; CASH, J.N.; ZABIK, M.J. Postharvest treatments for the reduction of Mancozeb in fresh apples. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v. 49, n.6, 3127-3132, 2001.

ICCO InternationalCocoaOrganization, **Produção Mundial de cacau**. Disponível em: <http://www.icco.org/>. Acesso em 10 de agosto de 2013.  
INAN, F. PALA, M. DOYMAZ I. Use of ozone in detoxification of aflatoxin B1 in red pepper. **Journal of Stored Products Research**, v. 43, n. 4, p. 425-429, 2007.

JAY, J. M. (trad. Eduardo Cesar Tondo et Al.). **Microbiologia de alimentos**. Rio Grande do Sul (Porto Alegre): Artmed, 2005. 710p.  
KELLS, S.A. et al. Efficacy and fumigation characteristics of ozone in stored maize. **Journal of Stored Products Research**, v. 37, n.4, p. 371-382, 2001.

KHADRE, M. A.; YOUSEF, A. E.; KIM, J. G. Microbiological aspects of ozone applications in food: A review. **Journal of Food Science**, v. 66, n.9, p. 1242-1252, 2001.

KOMPRDA, T. et al. Effect of starter culture, spice mix and storage time and temperature on biogenic amine content of dry fermented sausages. **Meat Science**, Amsterdam, v. 67, n. 4, p. 607-616, 2004.

KREIBICH, H.H. **Contaminantes biológicos em produtos de chocolate: parâmetros investigativos e medidas de controle**. TCC, Ciência e Tecnologia de Alimentos UFSC, SC, 2013.

KREIBICH, H.H. **Estudo da qualidade, segurança e estratégias de controle e descontaminação para o cacau (*Theobroma cacao* L.) e produtos de chocolate na redução de contaminantes biológicos**. Qualificação de Mestrado, Ciência e Tecnologia de Alimentos UFSC, SC, 2014.

KREIBICH, H.H.; SAVI, GIOVANA.; MOECKE, ELISA .; SCUSSEL, VILDES MARIA Easter eggs and other cocoa (*Theobroma cacao* L.) products quality: insects, mites, fungi and packaging versus critical control points. **Internacional Journal of Applied Science and Technology**, v.4., n.5, 2014.

KREIBICH, H.H.; MOECKE, E.; SCUSSEL, V.M. Cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans processing and storage conditions control for safe chocolate products. **Proceedings of 11th IWCSPP**,6, 639-650, 2015a.

KREIBICH, H.H.; MOECKE, E.; SCUSSEL, V.M. Biological contaminants control strategies for cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) better quality. **Intl Coffee, Cocoa and Tea Conf.** Aveiro, Portugal, 2015b.

LANA, T. G. **Caracterização genética e fisiológica de *Crinipellis pernicios***. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo. 91 pag., 2004.

LANGLAIS, B.; RECKHOW, D. A.; BRINK, D. R.; Ozone in Water Treatment. Application and Engineering. **Lewis Publishers**, Chelsea: Michigan, 592 p., 1991.

LANNES, S. C. S. ***Estudo comparativo entre manteiga de cacau e seus sucedâneos comerciais***. 101p. [Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo]. São Paulo, 1993.

LEUG, M.C.K.; DIAZ-LLANO, G.; SMITH, T.K. Mycotoxins in pet food: a review on worldwide prevalence and preventative strategies. **J. Agric. Food Chem.**, v.54, p.9.623-9.635, 2006.

LILLEHOJ, E.D. The aflatoxin in maize problem: The historical perspective. In: Workshop on aflatoxin in maize, el Batan, 1986. **Proceedings**. El Batan: CIMMYT, p.13-32, 1986.

LIMA, E.D.P.A.; PASTORE, G.M.; BARBERY, S.D.F.; GARCIA, N.H.P.; de Brito, E.S.; Lima, C.A.A. Obtenção e utilização de enzima polifenoxidase extraída de polpa de pinha madura no melhoramento do sabor de cacau. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 23(3): 709-713. 2008.

LORINI, I. **Controle integrado de pragas de grãos armazenados**. Passo Fundo, EMPRAPA-CNPT, 52p (EMPRAPA-CNPT. Documentos, 48), 1998.



LORINI, I. Descrição, biologia e danos das principais pragas de grãos armazenados. In: Lorini, Miike, Scussel, **Armazenagem de Grãos**. Cap. 7, Ed. Biogeneziz, Campinas SP, p. 381-397, 2002.

LORINI, I. **Manejo Integrado de Pragas de Grãos de Cereais Armazenados**. Passo Fundo, Embrapa Trigo, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2008.

MARTINI, M. H. **Caracterização das sementes de seis espécies de Theobroma em relação ao *Theobroma cacao* L.** Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas – SP. 2004.

MCDONOUGH, M.X. et al. Ozone application in a modified screw conveyor to treat grain for insect pests, fungal contaminants, and mycotoxins. **Journal of Stored Products Research**, v. 47, n. 3, p. 249-254, 2011.

MENDEZ, F. et al. Penetration of ozone into columns of stored grains and effects on chemical composition and processing performance. **Journal of Stored Products Research**, v. 39, n.1, p. 33-34, 2003.

MINIFIE, B. W. **Chocolate, cocoa and confectionery: science and technology**. 2.ed. Westport: AVI, 735p.1983.

MINIM, V. P. R. **Metodologia para determinação de sucedâneos da manteiga de cacau em chocolate**. 207p. (Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 1996.

NACHTIGALL, A. M. **Processamento de chocolate**. 25f. Trabalho (apresentado como requisito parcial da disciplina de Seminários) – Bacharelado em Química de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1999.

NEBESNY, E.; ZYZELEWICZ, D.; MOTYL, I.; LIBUDZISY, Z. Properties of sucrose-free chocolates enriched with lactic acid bacteria. **Europe Food Reseach Technology**, Berlin, v.220, p.358-162, 2005.

**NIERO, R., MALHEIRO, A. Métodos de separação e identificação de princípios ativos naturais. In: Simpósio ibero-americano de plantas medicinais,** 2010 Disponível em: [http://www.vsipm.com.br/html/arquivos\\_menu2/cursos/Curso\\_1.pdf](http://www.vsipm.com.br/html/arquivos_menu2/cursos/Curso_1.pdf). Acesso em: 13 de abril de 2015.

**NOGUEIRA, M.A.F. DE S. O Armazenamento de grãos nas regiões da grande Dourados e Sul-Fronteira do Mato Grosso do Sul com o Paraguai: um estudo de caso.** Dissertação de mestrado em Agronegócios. Universidade Federal de Mato Grosso do sul, Universidade de Brasília e Universidade Federal de Goiás. Campo Grande-MS/Brasília-DF/Goiânia-GO.132p, 2007.

**NORTHOLT, M.D. et al. Penicilic acid production by some fungal species in relation to water activity and temperature. J. Food Prot., v. 42, p. 476-484, 1979.**

**OETTERER, M.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; SPOTO, M. H. F. Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos.** Barueri – São Paulo: Manole, 2006. p.1-48.

**OLIVERI, C.; TORTA, L.; CATARA, V.A. polyphasic approach to the identification of ochratoxin A- producing black Aspergillus isolates from vineyards in sicily. International Journal of Food Microbiology, n.1-2, v.127, p. 147-154, 2008.**

**ONG, K.C. et al. Chlorine and ozone washes for pesticide removal from apples and processed apple sauce. Food Chemistry, v. 55, n.2, p. 153-160, 1996.**

**PACHECO, A.M.; SCUSSEL, V.M. Selenium and aflatoxin levels in raw Brazil nuts from the Eastern and Western Amazon basin. Journal Agriculture Food. 55(26): 11087-11092, 2006.**

**PACHECO, A.M.; SCUSSEL, V.M. Aflatoxin evaluation on in-shell and shelled dry Brazil nuts for export analysed by LC-MS/MS – 2006 and 2007 harvests. World Myco. J., 2009.**

**PÁDUA, I. P. M.; SILVEIRA I. A.; MARTINS, C. E. C. B. Aflatoxinas e risco de contaminação do leite humano. Pro Homine, v. 1, n. 1, 2002.**

PALOU, L. et al. Effects of continuous 0.3 ppm ozone exposure on decay development and physical responses of peaches and table grapes in cold storage. **Postharvest Biology and Technology**, v. 24, n.1, p. 39-48, 2002.

PATERSON, R.R.M.; LIMA, N. How will climate change affect mycotoxins in food? **Food Research Internacional**, Dublin, v. 43, n. 7, p. 1902-1914, Aug. 2010.

PELLETIER, M.J.; REIZNER, J.R. Comparison of fluorescence sorting and color sorting for the removal of aflatoxin from large groups of peanuts. **Peanut Science**, v.19, n.1, p.15-20, 1992.

PEREIRA, M.M.G.; CARVALHO, E.P.; PRADO, G. Crescimento e Produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v.20, n.1, 2002.

PEREZ, A.G. et al. Effect of ozone treatment on postharvest strawberry quality. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v. 47, n.4, p. 1652–1656, 1999.

PITT, J.I.; HOCKING, A.D. Fungi and food spoilage. 2ed. London: **Blackie Academic & Professional**, 593p., 1997.

PRADO, G. Incidência de Aflatoxina B1 em alimentos. **Ver. Farm. Bioq.**, v. 5, p. 147-157, 1983.

RESTAINO, L. et al. Efficacy of ozonated water against various food-related microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n.9, p. 3471-3475, 1995.

ROLIM, S. **A História do Chocolate**. São Paulo: Nutrociência Assessoria em nutrologia, 2008.  
<http://www.icb.ufmg.br/biq/prodap/teste.pdf> Acesso em: 13/02 2014.

ROSA, M. F. A. P. **Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de aflatoxina B1, aflatoxicol M1 e aflatoxicol por Cromatografia por camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência em amostras de patê de fígado industrializado**.1995. 60 f.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia Veterinária) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1995.

RUBINI, M. R.; SILVA-RIBEIRO, R. T.; POMELLA, A. W. V.; MAKI, C. S.; ARAÚJO, W. L.; SANTOS, D. R.; AZEVEDO, J. L. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom Disease. **International Journal Biological Science**, v. 1, n. 1, p. 24–33, 2005.

SANTOS, E.J. et al. Qualidade microbiológica de farinhas de carne e ossos produzidas no estado de Minas Gerais para a produção de ração animal. **Ciência Agropecuária**, Larvas, v. 24, n. 2, p. 425-433, 2000.

SANTOS, C.; FRAGA, M.E.; KOZAKIEWICZ, Z.; LIMA, N. Fourier transform infrared as a powerful technique for the identification and characterization of filamentous fungi and yeasts. **Research in Microbiology**, v. 161, p. 168-175, 2010.

SAVI, G. D. **Estratégias de controle e descontaminação do trigo em grãos (*Triticum aestivum* L.) com relação a fungos, micotoxinas e agrotóxicos utilizando compostos químicos e ozônio gasoso**. 246 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis – SC., 2014.

SAVI, G.D., PIACENTINI, K.C., BITTENCOURT, K.O., SCUSSEL, V.M. Ozone treatment efficiency on *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol degradation and its effects on whole wheat grains (*Triticum aestivum* L.) quality and germination. **J. Stored Prod. Res.** 59, 245-253, 2014a.

SAVI, G.D., PIACENTINI, K.C., SCUSSEL, V.M. Ozone treatment efficiency in *Aspergillus* and *Penicillium* growth inhibition and mycotoxin degradation of stored wheat grains (*Triticum aestivum* L.). **J. Food Proc. Preserv.** 1-9, 2014b.

SCARPARI, L. M.; MEINHARDT, L. W.; MAZZAFERA, P.; POMELLA, A. W. V.; SCHIAVINATO, M. A.; CASCARDO, J. C. M.; PEREIRA, G. A. G. Biochemical changes during the development of witches' broom: the most important disease of cocoa in Brazil caused by

*Crinipellis perniciosa*. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 413, p. 865–877, 2005.

SCHATZMAYR, G.; ZEHNER, F.; TAUBEL, M.; SCHATZMAYR, D.; KLIMITSCH, A.; LOIBNER, A.P.; BINDER, E. M. Microbiologicals for deactivating mycotoxins. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 50, n. 6, p. 543-551, 2006.

SCOTT, P.M. Natural poisons In: Helrich, K. **Official methods of analysis of the association of official analytical chemists**, ed. 15, Arlington. AOAC, p 1184- 1213, 1991.

SCUSSEL, V.M. **Atualidades em Micotoxinas e Armazenagem Qualitativa de Grãos I**, Ed VMS, Florianópolis, SC 382 pp, 2000.

SCUSSEL, V. M. Fungos em grãos armazenados. In: LORINI, I.; MIIKE, L.H.; SCUSSEL, V. M. **Armazenagem de grãos**.Cap. 9. Campinas: Biogeneziz, p. 675-691, 2002.

SCUSSEL, V.M. Aflatoxin and food safety: recent South American perspectives. **Journal Toxicology**, 179-216, 2004.

SCUSSEL, V. M; BEBER, M.; SOUZA, K. K. Problemas de micotoxinas nos grãos e os novos limites toleráveis na cadeia alimentar. In: **Anais da 5 Conferência Brasileira de Pós-Colheita**. Londrina: ABRAPOS, p. 84-93, 2010.

SCUSSEL, V.M., GIORDANO, B.N., SIMAO, V., MANFIO, D., GALVAO, S., RODRIGUES, M.N.F., 2011. Effect of Oxygen-Reducing Atmospheres on the Safety of Packaged Shelled Brazil Nuts during storage. **International Journal of Analytical Chemistry**, 1-9, 2011.

SHARMA, R.R. et al. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on inoculated alfalfa seeds with ozonated water and heat Treatment. **Journal of Food Protection**, v. 65, n.3, p. 447–451, 2002.

SILVA JUNIOR, Alves. **Manual de controle higienico-sanitario em alimentos**. 2. ed. Sao Paulo, Varela, 1996.

SOUSA, A. S. L. **Avaliação da estabilidade térmica e oxidativa de chocolates amargos**. 110 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa – PB, 2010.

TATAPUDI, P.; FENTON, J. M. Electrochemical oxidant generation for wastewater treatment. In: SEQUEIRA, C.A.C. **Environmental Oriented Electrochemistry**. Amsterdam: Elsevier, p. 103-130, 1994.

TEIXEIRA, A.S. **Adequação e apresentação de parâmetros de validação intralaboratorial de um ensaio para a quantificação de aflatoxinas em Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K) através de cromatografia líquida de alta eficiência**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. 57p, 2008.

THENHOLM, L.C.L. Binding agentes: to reduce the toxicity of mycotoxins in feed. In: SCUSSEL, V.M. **Atualidades em Micotoxinas e Armazenagem de Grãos**. Florianópolis: VMS, p. 177-185, 2000.

TIWARI, B.K. Application of ozone in grain processing. **Journal of Cereal Science**, v. 51, n. 3, p. 248-255, 2010.

TRABULSI, L. R. **Biologia dos fungos**. In: GOMPERTZ, O. F. et al. Microbiologia médica. São Paulo: Atheneu, p. 365-374, 1999.

URBANSKI, J. J. Sugarfree chocolate coatings. **Manuf. Confect.**, Glen Rock, v.83, n.6, p.61-67, 2003.

USEPA - United States Environmental Protection Agency. **Alternative disinfectants and oxidants guidance manual**, 1999. Disponível em: <[http://www.epa.gov/OGWDW/mdbp/alternative\\_disinfectants\\_guidance.pdf](http://www.epa.gov/OGWDW/mdbp/alternative_disinfectants_guidance.pdf)>. Acesso em: 30 mai. 2008.

WEBER, E. **Armazenamento agrícola**. Porto Alegre: Kepler-Weber Industrial, 400 p. 1995.

WEBER, E.A. **Armazenagem Agrícola**. Guaíba: Ed. Agropecuária 692 p., 2005.

WHITE, S. D.; MURPHY, P. T.; BERN, C. J.; LEEUWEN, J. van. Controlling deterioration of high- moisture maize with ozone treatment. **Journal of Stored Products Research**, p. 7-12, 2010.

[WHO] WORLD HEALTH ORGANIZATION. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives fifty-sixth meeting. **Safety evalution of certain food additives and contaminants-Aflatoxins**. Geneva. p.69. 1998a.

XU, L. Use of ozone to improve the safety of fresh fruits and vegetables. **Food Technology**, v.53, n.10, p. 58–61, 1999.

YESILCIMEN, A.M.; MURAT, OZDEMIR. Effect of different treatments on aflatoxin degradation and physicochemical properties of pistachios. **Journal Science Food Agriculture**, 2099-2104, 2006.

ZOLLNER, P; MAYER-HELM, B. Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography-atmospheric pressure ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, p. 123-169, 2006.





## **CAPÍTULO 2**

**Qualidade dos ovos de Páscoa e outros produtos de cacau  
(*Theobroma cacao* L.): insetos, ácaros, fungos e embalagens contra  
pontos de controle**



**ARTIGO PUBLICADO: Kreibich, H.H., Savi, G.D., Moecke, E.H., Scussel, V.M. Easter eggs and other cocoa (*Theobroma cacao* L.) products quality: insects, mites, fungi and packaging versus control points. *Internacional Journal of Applied Science and Technology*, v. 4, n. 5, 2014.**

**Easter eggs and other cocoa (*Theobroma cacao* L.) products quality: insects, mites, fungi and packaging versus control points**

Heloisa H. Kreibich<sup>1</sup>, Geovana D. Savi<sup>1</sup>, Elisa H. Moecke<sup>2</sup> and Vildes M. Scussel<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Mycotoxicology and Food Contaminants, Food Science and Technology Department, Center of Agricultural Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil; <sup>2</sup> Laboratory of Microscopy, Food Science and Technology Department, Center of Agricultural Sciences, Federal University of Santa Catarina. Rodovia Admar Gonzaga, n.1346, CEP: 88034-001, Itacorubi, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.

**Abstract**

The samples collected were sold in Florianópolis, Southern Brazil, and were tested for *light filths* (insects/larvae/rodent hair/mites-live/dead/fragments), as well as for *fungi* (total load/genera/species) and *packaging* (material type/sealing). From the total samples studied, different biological contaminants were detected in 53% of them. Fungi were isolated in 41% of the total samples, mainly *Penicillium*, *Aspergillus* and *Rhizopus*. Regarding packagings, despite of their number of different material layers, 9% did not comply to the current packaging regulation regarding perforations stains and insect/larvae presence. In addition, a total of 15% of the inner contents showed darker spots, oxidation/rancid odor and perforations too. Indeed, the chocolate products of those insects damaged packages, showed also live larvae in the chocolate mass, quite disgusting to consumers. The contamination CPs of the factory processing steps identified were: raw materials reception; chocolate manufacturing; packaging; storage; transport and commercialization (sold too close to shelf life expiring date).

**Keywords:** cocoa, *Theobroma cacao*, chocolate, Easter egg, packaging, insects, fungi

## 1 Introduction

According to the Cocoa, Peanuts and Candies Brazilian Industries Association (ABICAB), the country chocolate production has shown an increase of 12 % in the last years, from 562,000 tons in the year 2010 to 790,000 tons in 2013, setting the country as the third largest market in the world, just behind the United States and Germany (ABICAB 2014). Only in 2013 the country produced 18,000 tons of chocolate (80 million Easter eggs) just for the country's Easter season. One of the main reasons for that high consumption is the current Class C Brazilian population increasing income (CEPLAC 2013; ABICAB 2014).

Regarding the quality of chocolate products, it depends upon several factors involving different stages of processing. Although chocolate is prepared from a mixture of cocoa paste, sugar and milk, its production starts far behind, from the cocoa bean (*Theobroma cacao* L.) cultivation / harvesting / fermentation / drying / roasting & grinding for cocoa paste formation which is sold to the chocolate manufacturers for further processing (Beckett 1994; Nachtigall 1999; Oetterer *et al.* 2006).

For the production of a good and safe quality chocolate, it is important to pay attention on the two main processing steps: the (a) *cocoa bean to paste preparation* and (b) *chocolate mixture to final product release*, in which the temperature levels and their variation are crucial. In (a), for the processing steps of bean fermentation, drying, roasting and paste formation it is necessary to keep the temperatures at 50, 55, 120 and 42°C, respectively. On the other hand, for (b) the chocolate processing of mashing (ingredients mixing), refining, maturation, conching, tempering and molding the temperatures need to be around 45/65, 50, 50, 46/70, 40/50 and 18°C, respectively (i.e., temperatures of melting and formatting) (Beckett 1994; Bastos 2003; Oetterer *et al.* 2006). However, none of them are enough to kill some biological contaminants such as insects and their larvae and so fungi spores (Beckett 1994).

All those steps and mild temperatures (up to the ready-made product), followed by storages, transportation and commercialization present conditions to allow the entry and/or proliferation of several biological contaminants, such as insects, (their larvae / pupa stages) mites and contact to rodents (indicated by hair presence) (Lorini *et al.* 2002; Lorini *et al.* 2008; Mello *et al.* 2004; Gredilha *et al.* 2007; Kreibich 2013). These contaminants (called light filth) are important microorganisms carriers (fungi, bacteria, viruses) including their residues

and metabolites (faeces / toxins) to food and temperature resistant (Koerich de Souza 2013; Kreibich 2013). The mites, which develop in stored products, can trigger consumers' allergic reactions. In addition, improper packaging can allow both, contaminants as well as aroma transfer to chocolate components, leading to mycotoxin formation and/or lipid oxidation (Mello *et al.* 2004; Gredilha *et al.* 2007).

For those reasons, chocolate products should be manufactured with selected raw materials (cocoa paste), made with healthy and clean (free of insects / parasites / plant waste / animal and earthy matter) cocoa beans, as well as with utilization of packaging that protect the final product adequately and well / tightly sealed to avoid contaminants entry. However, there are little information and lack of proper inspection on those stages of cocoa paste preparation (in the factories) or chocolate products (in the industries facilities). In addition, Easter eggs, which are highly produced to be consumed, in a short period of time, need to be checked for quality / safety conditions and to learn what is done with seasons left overs; not sold products.

Therefore, this study aimed to evaluate the quality and safety of Easter eggs and other chocolate products sold in the Southern of Brazil for either macro and stereo / micro (light filth - microorganism carriers) biological agents contamination, as well as to assess and recommend implementation of systems (critical points control) to improve the quality of chocolate through manufacturing procedures.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Material

**2.1.1 Samples:** chocolate products (34), milk and semi-sweet Type, of different brands, in the formats of *Easter eggs* [plain and stuffed], *bars* [with and without fruit, nuts, and/or mixtures of both], *bonbons* [(a) plain and (b) stuffed with (b.1) fruit/nuts/grains or (b.2) artificial fruit flavors cream], *truffles* [creamy or filled with fruit/nuts] and *smarties* [milk Type tablets with colored cover]. Table 1 shows the Easter eggs and cocoa product samples different characteristics (format/chocolate Type/filling/brands/weight/number).

**2.1.2 Chemicals and culture media:** (a) *chemicals* - potassium hydrogen phosphate, sodium nitrate, potassium chloride, magnesium sulfate, ferrous sulfate and sodium lauryl sulfate, all from Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brazil); liquid petrolatum, sucrose, glycerol, chloramphenicol, all from Kyma (Americana, Brazil); lactophenol

cotton blue, Laborclin (Pinhais, PR, Brazil) and *(b) culture media* - potato dextrose agar (PDA), malt extract (MEA) and bacteriological peptone, all from Himedia (Curitiba, Brazil), Czapek-dox, 25 % glycerol nitrate (G25N), Czapek yeast extract (CYA), all Vetec (Duque de Caxias, Brazil).

**2.1.3 Equipment:** stereo microscope, model MZ-16 (Wetzlar, Germany); light microscope, model CH-BI45-2, Olympus (Tokyo, Japan); microscope video printer, model Image, Pro Express (Baltimore, USA); semi-analytical scale, Kern (Balingen, Germany); heater platform, Dist (Florianópolis, Brazil); stirring hot plate, model AV-50, Dist (Florianópolis, Brazil); autoclave, Phoenix (Araraquara, Brazil); microwave, Sharp (Sao Paulo, Brazil); sample homogenizer, model MA440/CF, Marconi (Piracicaba, Brazil); microbiological oven, Quimis (Diadema, Brazil); colony counter, model CP608, Phoenix (Araraquara, Brazil); heating block, model EQ-18MT, Tecnal (Piracicaba, Brazil); ultra-violet cabin model model 118, (short & long wavelength: 254 & 360 nm, respectively), Dist (Florianópolis, Brazil) and vacuum pump, model TE058, Millipore (Sao Paulo, Brazil).

**2.1.4. Others:** Wildman filth bottle trap (Erlenmeyer-2 L with metal rod and rubber cap – 250 and 60/30/50 mm for length and lower/upper/height, respectively), Dist (Florianópolis, Brazil); Buchner funnel (13 cm diameter); glass bottles with polyethylene cap (200 mL); granulometric sieves (200 mesh), Bertel (Sao Paulo, Brazil); filter paper No. 4, Whatman (Maidston, England); magnetic bar (250/80 mm, length/width) and Software Pro-Express 4.0, Windows 95/NT/98, (Silver Spring, MS, USA).

## 2.2 Methods

**2.2.1 Sample collection and preparation:** *(a) collection* - chocolate products (eggs\*/bars/bonbons truffles and smarties) were randomly collected from supermarkets in the city of Florianópolis, state of Santa Catarina, Southern Brazil, from March/2013 to March/2014 (\*Easter eggs were only collected during both years Easter time – around 2 months before and up to 2 days after Easter – as those product are only commercialized during Easter seasons). Samples were registered, inspected for sealing integrity and stored in a light free area for further analyses. *(b) preparation* - each chocolate sample was aseptically packaging opened followed by *(b.1) packaging* and *(b.2)*

*internal content* (chocolate product), separation in two different containers for the following analysis: *packaging/label* (MACRO: characteristics/integrity) and *internal content* (MACRO: characteristics / integrity / composition / expiring date *versus purchasing date*&STEREO/MICRO: light filth - insects/mites/rodent hair and mycology - total load/genera/species/toxicity).

**2.2.2 Packaging and internal product characteristics & integrity evaluation:** both, packaging and the inner chocolate content were evaluated macro/stereoscopically, by checking visual (naked eye/stereoscope) alterations. (a) *packaging* - samples were evaluated for their type (material used / number of protective layers), integrity (presence of perforations / color changes / stains / defective sealing/format deformation) according to the method of de Souza Koerich, et al (2013). On the other hand, the packaging functions such as product containment; type of protective materials, ease of handling / storage / transportation, regarding the Brazilian and international regulations, were also evaluated by applying the Moura and Banzato (1997) method. (b) *internal content* - the following characteristics of each product were macro / stereo evaluated as well as obtained from the labels information: format / chocolate type / plain or stuffed / weight / batch number / expiring date / apart from products sensorial characteristics (color/odor/texture), integrity (damages on/in/the products) and composition (cocoa/lipids/sucrose).

**2.2.3 Light filth analysis:** was carried out according to the AOAC (2005) method, art. 965.38 by stereoscopy for cocoa, chocolate and candies. Briefly, (a) *fat extraction* - a portion of the grind sample (100 g), had sodium lauryl sulfate 2% (500 mL) added, followed by sieve transfer, with hot water added (until the fat sample did not pass over the sieve); (b) *transfer* - the content was transferred to a Wildman filth bottle trap maintained under heating (10 min). Next, the flask was cooled (room temperature) and liquid petrolatum added, followed by water (until completion-1L). The flask trap stirring rod was held with tweezers above the liquid surface (2 immiscible phases) and added a magnetic stirring bar to accelerate separation, with further heating (5 min). At the end of this step, the flask was allowed to stand (30 min); (c) *light filth separation and microscopic identification* - petroleum phase (with light filths) was removed by vacuum filtration and dried at 105°C. The filter paper was transferred to the stereo microscope, where light filths reading (counting) and image identification (filths

characterizations) through an Image-ProExpress software, was performed.

**2.2.4 Mycology tests:**(a) *total fungi count* - samples (25g) were transferred into sterile polyethylene bags and added 0.1% peptone water (225 ml), followed by homogenization in a stomacher. Each diluted sample, had a volume of 100  $\mu$ L (0.1 ml) inoculated to PDA medium surface (n = 2) containing chloramphenicol (100 mg/L) in a laminar flow hood and incubated at 25°C $\pm$ 1°C for 7 days (Silva *et al.* 2010). The colonies developed were counted and expressed as colony forming unit per gram (CFU / g). (b) *colonies isolation* - the colonies were then transferred to MEA, G25N & CYA, incubated (25°C $\pm$ 1°C for 7 days) and observed macroscopically (diameters and individual characteristics) followed by microscopy identification of fungi genera/species (Raper and Fennel 1965; Pitt 1979; Barnett and Hunter 1986) and (c) *genera/species identification* - a support was added on a glass slide in a Petri dish, then cubes (5 cm) of G25N grown colony were placed in the middle and lid covered. Inside the plate, was added a piece of moist cotton. After incubation, the stained slides were viewed under light microscope and identified according to Raper and Fennell (1965); Pitt (1979); Barnett and Hunter (1986).

**2.2.5 Contamination critical control points:**the following stages of chocolate production were evaluated to identify the possible critical points (CP) of contaminants (rodents/insects/mites/fungi) entry / proliferation, including temperatures conditions - *raw material reception* (quality, damage, moisture content), *processing* (temperature, time), *storage* (type of warehouse, with / without ventilation, temperature, time) and *transport / selling* (careful handling, temperature, expiring date) points. From the CP identification, control measures for reduction / prevention of those contaminant were recommended. Figure 1 shows the flowchart of all steps involved in the study on biological contaminants of the Easter eggs and chocolate products.

### 3 Results and discussion

From the data obtained, it was possible to register some macro & micro alterations caused by the presence of biological contaminants and so their detection in the Easter eggs and chocolate products surveyed. They were detected, either in the *packaging* (material/sealing damages) and *inner contents* (chocolate mass perforations / live & dead



larvae presence). Also light filth (which can only be detected by means of a prior solvent extraction from chocolate sample and through stereo microscopy) was registered in some samples and so storage fungi. Figure 2 and Tables 1-4 show the packaging & chocolate internal products macro alterations, light filth (insects, larvae and mites - whole/fragments) and fungi data, respectively.

### ***3.1 Packaging and internal products macro characteristics and integrity***

**(a) Packaging:** as far as chocolate products packaging and quality are concerned, most of them (91.2 %) were in good conditions (not presenting damage or stains), made of resistant material (polyethylene, aluminum and cardboard in several layers) and sealed tight (nor faulty, unbroken or loose sealing), indicating the use of adequate materials and calibrated sealing equipment (Table 1). On the other hand, the other 8,8 % samples packaging (Easter egg, chocolate bar and truffles - one sample each) showed visible alterations as follows. The Easter egg, although was double packaged into two separated material types (a transparent cellophane wrapping and a hard cardboard box), which should protect it, had visible insect damages (perforations and stains), apart from the presence of live larvae, contributing to the inner product contamination (Figures 2a.1, 2a.2). Apart from that, the thin cellophane sheet was only wrapped around the chocolate egg tight with a loose silky lace or top (a insects way in). On the other hand, the box was not sealed at the bottom on top (only closed together by folded flaps) (Figure 2a.1). All, indicating the packaging protection fragility. Those lack of sealing, might have allowed biological contaminants entry, thus causing those detected damages. Indeed, live larvae were detected inside the egg (Section 3.2). Regarding the chocolate bar sample (containing raisins and cashew nuts), it also presented packaging perforations and stains (Figure 2.a.3) and so larvae proliferation (Section 3.2). Regardless of the damages and contamination detected, the altered packaging samples (Easter egg and bar) were within their shelf life validity period. However, somewhat short ie., only at 3 and 4 months to their expiring date, respectively (Table 1). The type of packaging/sealing utilized together with the storage time (closer to the expiring date) and temperature would certainly allow insects proliferation (conditions for eggs to hatch). Regarding the information – i.e. date of batch/lot production, none of the packaging evaluated had

referred the *date they were manufactured on the label* (so why shelf life setting if there is no starting point?). That leaves the consumer with the uncertainty on when the product was actually produced or whether it was sent to be re-processed (end of season's stores left overs returned to industry for new chocolate processing). There is no enforcement by regulation to refrain that.

**(b) Internal product:** CHOCOLATE MASS - as expected, apart from the 85.3% in good conditions internal products samples, those packaging integrity alterations detected above (Section 3.1.a), led to similar alterations (chocolate mass perforations and visible contaminants detection) of those chocolate samples (Figure 2b, Table 1). In addition, apart from the two samples (Easter egg and bar), other chocolate products (bars and truffles) also had alterations corresponding to 14.7% (5) of them. It was observed whitish stains (discoloration in some chocolate parts of the products), high fat flavor, chocolate mass perforations and larvae (live) presence in the surveyed samples. They were mainly in bars, followed by the Easter egg and truffle in 8.85, 2.95 and 2.95 % of the samples, respectively (Figure 2b, Table 1). In the positive total chocolate bar samples, their contamination probably occurred due to the mild temperatures applied in the processing steps including tempering. Important to emphasize that, the temperatures of 40-50°C, do not kill or interfere on the insects proliferation (larvae to pupa or eggs hatching), either during the chocolate mass melting or solidification stages. Especially after packaging (micro environment) and storage (temperature & time), if eggs are also present. As far as chocolate products ingredients (mono/di- carbohydrates), such as *sugar* (sucrose) and *dried fruits* (fructose) are concerned, they can attract/bring ants (*Linnepithema* genera) into the product (Lorini 2002). Apart from *cocoa beans*, also the *cocoa paste* may carry insects such as moths (*Ephestia* genera) allowing further product infestations (Lorini and Schneider 1994; Lorini 1998) getting into the paste, either during its preparation or storage (Kreibich 2013). Although the chocolate mass *fat* content (esterified soya oil and cocoa butter) does not add to the biological contaminants, it may harm consumers' health as its percentage was rather high (2.9-5.2 g in a total 16 g chocolate portion), and so the *sugar* (7.0-12.0 g per 16 g), the possible source of insect contamination (ants) detected in the current work (Table 1). CHOCOLATE FILLING & STUFFING - regarding the other ingredients included in the chocolate products, either as a *filling* (mixed in the chocolate mass – Figure 2b.6) or *stuffing* (added into a chocolate cavity

- Figures 2b.2, 2b.3), they were of different groups: (a) *dry fruits* (raisins / sherries / strawberries), (b) *nuts* (cashew / peanuts / hazel / coconuts), (c) *cereal* (barley malt / corn & rice flakes), (d) *soy bean creams* (different artificial flavors added) and (e) *liquor*. Those ingredients could also contribute to the inclusion of some biological contaminants into the chocolate samples (Figures 2b.3,b.6). The only detected were those of cocoa (larvae: *Ephestia elutella*) and sugar/fruits characteristics, \*\* (sugar ants of the genus *Camponitus* and *Linepithema* and dry fruit beetle of the genus *Carpophilus*). See details in Section 3.2. Important to emphasize that, dry fruits have been reported being fungi infected which may lead to toxin contamination (Scussel *et al.* 2002; Souza Koerich *et al.* 2010), thus care on selecting the raw materials and ingredients are quite crucial. However not highly detected in the current work (Section 3.3 - Tables 2,4) (Drusch and Ragab 2003; Souza Koerich *et al.* 2010). As far as the type of the chocolate mass, are concerned, some chocolate products had in their compositions: milk whey /soya oil / different percentages of sugar, which also could make a difference on contaminants presence (less in esterified soya oil creams or milk whey).

### 3.2. Light filth identification, quantification versus regulation

A total of 53% of the samples surveyed, present some type of biological impurities that usually are not visible in the samples (Section 3.1). They need to be submitted to solvents extraction and concentration (for possible stereoscopy visualization) prior identification and quantification. They are the light filth, presented whole or as fragments (ground during processing), and considered indicators of bad quality and handling conditions of raw material utilized. In the current study, insects, either whole or fragments and so their larvae and pupa (growing stages) were identified. Tables 2 and 3 show the positive samples percentage, each light filth type detected, their characteristics and effects on food/consumers. From the positive samples (eggs, bars, bonbons or truffles), 29.4(10) and 23.5(8) % of them had either only one or more than one type (2 to 5) of light filth per sample, respectively.

The detected ones were (a) insects (a.1) whole & fragments of ants (*Camponitus consobrinus* L.; *Linepithema humile*) and (a.2) larvae & pupa stages, inactive immature insect form between larva and adult of chocolate moth (*Ephestia elutella*) (Figure 3), followed by (b) whole mites (*Aceria anthocoptes*). They were found in 20 / 20 / 10 / 50 % of eggs / bars / bonbons / smarties samples, respectively. Only the truffles did not have light filth detected. Regarding the source of insects

infestation, i.e., the entrance of *ants*, they probably came from the ingredients (sugar / dried fruits) added at the chocolate mixture and / or the filling / stuffing inclusion step (lack of fruits/nuts quality / factory environment cleaning) or got into the sugar/dry fruits during their storage - prior mixture. On the other hand, the *chocolate moth* larvae, which are commonly found (accepted by regulation though - FAO, 2014), might come from either through cocoa paste infestation (at its factory), ingredients mix (during industry chocolate production) and/or the final products moth eggs hatching inside packaging (Figure 2.a) As they are resistant and persistent to the mild processing temperatures and commercialization storage at selling stores. Important to emphasize that the total moth life cycle is 35 to 50 days. Adult phase lasts 10 to 20 days; the eggs delivery take 4 to 7 days to hatching; has 4 to 8 weeks and pupa has 5 to 10 days, respectively, as well as the harm to food & consumers they can cause (Lorini and Schneider 1994; Lorini 2008).

On the other hand, *mites* (allergy promoters) were detected in 17.64 (5) % of the samples, mainly in the chocolate bars, followed by the Easter eggs and only one bonbon and smartie sample (Table 2). Fortunately, rodents' hair was not detected in any of the samples, which indicates that both processing plants (cocoa paste factories and chocolate industries) applied rodent control programs, thus preventing several rats transmitted diseases related to products (Table 3) (Giordano *et al.* 2008; Lorini 2008; Kreibich 2013).

QUALITY/SAFETY INDICATORS - the main purpose of controlling the light filths in food, is that they are indicators of raw material, ingredients and processes sanitary quality and safety. They are considered vectors of several diseases (bacteria/fungi/virus) that may affect consumers and also can cause alteration to the final products (reduction of dry matter / nutritional value/ sensory characteristics) leading to fermentation and/or deterioration. Therefore, entry of light filth in food should be minimized and/or controlled to protect consumers and keep food/chocolate products sensory and nutritional quality. Under the Brazilian Resolution 14/2014, it is considered harmful to human health different matters detected either macro or microscopically apart from insects also (at any development stage, living or dead, whole or in fragments) recognized as vectors; parasites; insects excrement; hard or sharp objects that may cause injury to the consumer. Although, larvae do not harm health directly, they will be very difficult to be accepted by consumer to find grubs and insects in side the chocolate (BRASIL 2014).

### 3.3 Fungi isolated in the chocolate products and their identification

As expected, the chocolate products samples total fungi load was not high, as they have low humidity (moisture content and water activity of <3% and <0.2, respectively), thus not optimum environment for them to grow (BRASIL 1978). Tables 2 and 4 show the fungi quantitative data and the genera/species isolated from the different chocolate sample types. A high percentage of the samples (59 %) did not present fungi growth (NG) ie., no spores contamination that could allow them to grow on the mycological media utilized (Table 2). Only 41 % of the samples had them grown, whoever at rather low count ( $1-3 \times 10$  UFC/g) and below the maximum allowed by the Brazilian regulation ( $<1 \times 10^3$ ) (BRASIL 1978). The Easter eggs were more contaminated and surprisingly no truffles samples had fungi isolated (even with their varied types of stuffing utilized). Despite of the low fungi load, from the 41% of the samples fungi strains isolated, 19, 18 and 4% were of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Rhysopus* spps, respectively (Table 4). Important to emphasize that one isolated strain was aflatoxigenic, indicating the importance to control the samples fungi growth conditions as well as to select safe/high quality raw materials (aflatoxin free) to avoid final product contamination. That sample did not contain either nuts or cereal stuffing (which could be the fungi & toxin vectors). Studies conducted have reported high fungi growth, mainly on cocoa beans (raw material) due to faulty/inefficient (heterogeneous/high humidity content) drying processes (Samson *et al.* 2002; Pitt and Hocking 2009; Copetti *et al.* 2011; Genovese 2009). In addition to beans fungi deterioration and consequent influence on the quality of cocoa paste and chocolate, their metabolites (mycotoxins) can remain stable in the final products due to whole processing mild temperatures / conditions applied ( Scussel 2002; Neto 2009).

### 3.4 Whole processing stages of contamination critical control points

From the different samples macro packaging / inner product damages / insects visualization and the light filth biological contaminants detected, it was possible to identify the most prone critical CPs of their entry & proliferation, thus to recommend some control measures to be applied. (a) **Contaminants critical control points**: the main CPs that contamination can entry the processing stages were at the (a.1) *factoryreception* due to the use of low quality raw materials (cocoa paste infested - use of moldy/insect infested cocoa beans and so

sugar with ants), as well as during the (a.2) *chocolate manufacturing* (and / or reprocessing) with proliferation or access of those contaminants to food. Also from *the packaging* (rupture or its poor quality), *transport*, *storage* and / or *commercialization* (lack of environment cleaning). (b) ***Recommended control measures:*** among the entry points of contamination and its possible control measures to be adopted, it was observed that these contaminants must have gotten into the products during the steps: *reception* of raw materials (quality cocoa and sugar paste), *processing* (cleaning machine / stops during processing), *packaging* (packaging / sealing of low quality); *handling* (during transport and marketing) and *shelf life* (about the time allowed). Actions should be applied from crop management (to get good quality cocoa beans followed by their proper fermentation and drying. The same showed occurs with sugar and thefat (to be added) cocoa butter and sterified soil to raw materials (Good Management Practices), in the manufacture of food during the production stages (HPCC, ISO), and work to clarify the responsibility of producers, transporters, distributors, and marketers of foods that contribute to the reduction of population exposure to consumption of contaminated food and consequently the reduction of health risk . Important to emphasize that the light filths are transmitter of deterioration, pathogenic and/or toxigenic microorganisms to food, which may allow bacterial and fungal spreading, as well as promote the development of diseases and intoxications (mycotoxins).

#### 4 Conclusion

Most of the Easter eggs and cocoa products packaging characteristics and integrity were adequate, however only some of them had visible alterations. Despite that, no consumer would like to see/consume a cocoa product within a damaged pack, which is an indication of finding further problems inside (confirmed in the current study: live larvae inside pack and product).

Regarding the shelf life date, the Easter eggs samples had it too close from purchasing (expiring date) and none of the cocoa products surveyed had the processing date registered on the label. Chocolate reprocessing i.e., left over's returned from selling stores to the industries to be re-processed into new chocolate products should not be allowed, however there is no regulation to enforce that yet.

On the other hand, the samples inner content showed more damages than those wrapped in the damaged packaging. They had higher percentage of stains, rancid fat flavor, and larvae perforations. Over 50

% of chocolate products – Easter eggs and bars - contained some light filth (whole/fragmented insects, live/dead larvae/pupa and mites). Reduced number of mites is allowed by law as long as it doesn't mean the final product hazards health consumption). Based on current regulation, it allows sample evaluated for consumption (except the sample with whole insects - ants).

The fungi assessment, allowed us to register *Aspergillus*, *Penicillium* and *Rhizopus* samples, in low count though, below current regulation. However, an aflatoxigenic strain was isolated indicating need for care on processing and selection of raw material (mainly cocoa bean) used, since that are aflatoxins producers.

Despite that Regulations do not consider light filth presence as harm; no consumer accepts seeing live (moving) or dead larvae in the chocolate mass/stuffing.

There is a need of standard implementation of the established processes applied to the chocolate industry in order to solve these PCs and ensure products integrity, safety to assure consumers acceptability and so the left over re-processing.

The current study can serve as subsidy for chocolate industries to reduce insect infestation; regulatory agencies to future biological contaminants adjustments and applications on preventive and control measures to improve product quality.

## References

ABICAB. (2014). Brazilian Association of the Industry of Chocolate, Cocoa, Candy and Derivatives. Available: <http://www.abicab.org.br>. Access in: 11/05/2014.

AOAC. (2005). Association Official Method of Analysis of AOAC international. Thiex, NJW (E.d.). Official Methods of Analysis. 18.ed. Maryland: AOAC International.

Barnett, H. L. & Hunter, B.B. (1986). Illustrated genera of imperfect fungi. New York: Macmillan Publishing Company, 218p.

Bastos, C. P. (2003). Processamento de Chocolate. 17f. Trabalho (apresentado como requisito parcial da disciplina de Seminários) – Bacharelado em Química de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas

Beckett, S. T.(1994).Industrial Chocolate Manufacture and Use.Fourth Edition. York: Wiley-Blackwell.

BRASIL. (1978).Ministry of Health National Health Surveillance Agency.Area of Expertise.Food.Legislation.Specific Legislation by Subject Area.Technical Regulation by Subject.Technical Regulations for Chocolate and Cocoa. Resolution of the executive board RDC N.12 OF 24 JULY 1978. Available: [http://www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/resol/12\\_78.htm](http://www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/resol/12_78.htm). Access in: 25/03/2014.

BRASIL(2014).Ministry of Health National Health Surveillance Agency.Area of Expertise.Food.Legislation.Specific Legislation by Subject Area.Technical Regulationby Subject. Technical Regulations forchocolate and cocoa.Resolution of the executive board RDC No.14 of March 28, 2014. Available: <http://www.abic.com.br/publicue/media/resANVISA%2014-2014.pdf>. Access in: 15/06/2014.

CEPLAC. (2013).Executive Committee of the Plan of Cocoa Farming.Ministry of Agriculture and Agrarian Reform.Indication of cocoa varieties for commercial cultivation-Network evaluation of clone son a large scale.

Drusch, S., & Ragab, W. (2003) .Mycotoxins in Fruits, Fruit Juices, and Dried Fruits. Journal of Food Control, 66, 1514-1527.

FAO. (2014) .Food and Agriculture Organization of the United Nations.Food Outlok – Global Market Analysis, Wheat, 1997. Available: <<http://www.fao.org>>. Access in: 05/05/2014.

Genovese, M. I., & Lannes, S. C. S. (2009). Comparison of total phenolic content and antiradical capacity of powders and “chocolates” from cocoa and cupuassu. Ciência e Tecnologia de Alimentos, 29, 810-814.

Giordano, B.N.E., Simão, V., & Scussel, V.M. (2008). Effect of O<sub>3</sub> gas on Brazil nut mycoflora and aflatoxin reduction. In: Controlled Atmosphere and Fumigation in Stored Products, Chengdu, China. Proc. of 8th Int. Conf. on Controlled Atmosphere & Fumigation in Stored Products. Chengdu, China, p. 214-220, 2008.*DOI*:10.1155/2011/813591



- Gredilha, R. & Lima, A.F. (2007). First record of *Necrobia rufipes* associated with pet food in Brazil (De Geer, 1775) (Coleoptera; Cleridae). *Braz. J. Biol.* 67- 87.
- Koerich, K. S., Tonon, K. M. & Scussel, V. M. (2013). Labels layout of cats and dogs food sold in Brazil and their national regulation adequacy. *Cienc. Rural (UFSC. Impresso)*, 43, 366-369.
- Kreibich, H.H. (2013). Contaminantes biológicos em produtos de chocolate: parâmetros investigativos e medidas de controle. TCC, Ciência e Tecnologia de Alimentos UFSC, SC.
- Kreibich, H.H., Christ, D. Silva, J., Savi, G.D., Scussel, V.M. (2015). Decontamination of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) inoculated with *Aspergillus flavus* by ozone gas *Journal Ozone: Science & Engineering* (in press).
- Lorini, I. & Schneider, S. (1994). Pragas de grãos armazenados: resultados de pesquisa. Passo Fundo: EMBRAPA-CNPT, 47p.
- Lorini, I. (1998). Controle integrado de pragas de grãos armazenados. Passo Fundo, EMBRAPA-CNPT, Documentos, 48, 52p.
- Lorini, I. (2008). Manejo Integrado de Pragas de Grãos de Cereais Armazenados. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 72p.
- Mello, R.P., Gredilha, R. & Guimarães-Neto, E.G. (2004). Dados preliminares sobre sinantropia de califorídeos (Diptera: Calliphoridae) no município de Paracambi-RJ. *Revista Universitária Rural. Série Ciências da Vida, UFRRJ Seropédica-RJ.*, 24, 97-101.
- Moura, R. & Banzato, J. M. (1997). Embalagem, utilização e containerização. São Paulo: IMAM.
- Nachtigall, A. M. (1999). Processamento de chocolate. Pelotas, 25f. Trabalho (apresentado como requisito parcial da disciplina de Seminários) – Bacharelado em Química de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- Netto, C. G. (2009). Pesquisa mostra como micotoxinas migram do cacau para o chocolate.

Available in: <[http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp\\_hoje/ju/setembro2009/ju443pdf/Pag05.pdf](http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp_hoje/ju/setembro2009/ju443pdf/Pag05.pdf)>. Access in: 22/08/2013.

Oetterer, M., Regitano-D'arce, M. A. B. & Spoto, M. H. F. (2006). Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Barueri – São Paulo: Manole.

Pitt, J.I. (1979). The genus *Penicillium* and its teleomorphs states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. London: Academic Press, 634p.

Pitt, J.I. & Hocking, A.D. (2009). Fungi and food spoilage, third ed. Springer, New York.

Raper, K. B. & Fennell, D.I. (1965). The genus *Aspergillus*. Baltimore: The Williams & Wilkins Company, 686p.

Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C. & Filtenborg, O. (2002). Introduction to food- and airborne fungi. CBS, The Netherlands.

Scussel, V.M., Lorini, I. & Mike, L.H. (2002). Fatores que favorecem o desenvolvimento de fungos e produção de toxinas. In: Scussel, V.M.; Lorini, I.; Mike, L.H. Armazenagem de grãos. Cap. 9. Campinas: São Paulo, 739-756.

Silva, N., Junqueira, V.C.A., Silveira, N.F.A., Taniwaki, M.H., Santos, R.F.S. & Gomes, R.A.R. (2010). Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água. (4th ed.). São Paulo: Varela, 624 p.

Souza Koerich, K., Nones, J., Teixeira, M. S. , da Silva, T. W., Moeke, E.H.S. & Scussel, V. M. (2010). Identification of light filth in dogs food commercialized in open bulky bags In: Scussel, V.M., Nones, J., de Souza Koerich, K., Santana, F.C. de O., Beber, M., Neves, L.S.D'e., Manfio, D. International Conference on pet food quality and safety & 14th National Mycotoxin Meeting, 14, Florianópolis. Abstract Book.

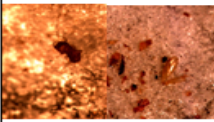

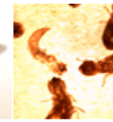
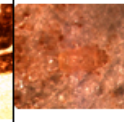


**Table 2.** Different light filth and fungi detected in easter eggs and other chocolate products commercialized in Florianopolis, Santa Catarina State, Southern Brazil (march 2013 to march 2014)

CHOCOLATE PRODUCT		LIGHT FILTH					FUNGI			
Type	Number	INSECTS		STAGE		RODENT HAIR	MITES	TOTAL / SAMPLE	TOTAL COUNT (CFU/g)	GENERA
		Whole	Fragment	Larvae	Pupa					
EASTER EGGS (n=10)										
01	ND	02	12	02	ND	ND	16	3x10 <sup>1</sup>	Aspergillus	
02	ND	ND	ND	ND	ND	01	01	1x10 <sup>1</sup>	Aspergillus	
03	ND	01	ND	ND	ND	ND	01	NG	NA	
04	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NG	NA	
05	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NG	NA	
06	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NG	NA	
07	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NG	NA	
08	ND	01	ND	ND	ND	ND	01	2x10 <sup>1</sup>	Aspergillus	
09	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2x10 <sup>1</sup>	Aspergillus	
10	ND	01	ND	ND	ND	ND	01	02	1x10 <sup>1</sup>	Rhizopus
BARS (n=10)										
01	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NG	NA	
02	ND	ND	02	ND	ND	ND	01	03	1x10 <sup>1</sup>	Aspergillus
03	ND	01	ND	ND	ND	ND	02	03	1x10 <sup>1</sup>	Penicillium
04	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NG	NA	
05	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NG	NA	
06	ND	01	ND	ND	ND	ND	01	NG	NA	
07	ND	01	ND	ND	ND	ND	01	NG	NA	
08	ND	01	ND	ND	ND	ND	01	NG	NA	
09	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NG	NA	
10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NG	NA	
BONBONS (n=10)										
01	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NG	NA	
02	ND	03	ND	ND	ND	ND	03	1x10 <sup>1</sup>	Penicillium	
03	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NG	NA	
04	ND	01	ND	ND	ND	ND	01	NG	NA	
05	ND	ND	ND	ND	ND	ND	01	1x10 <sup>1</sup>	Penicillium	
06	ND	03	ND	02	ND	ND	05	1x10 <sup>1</sup>	Penicillium	
07	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NG	NA	
08	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NG	NA	
09	ND	ND	ND	01	ND	ND	ND	NG	NA	
10	13	02	ND	03	ND	ND	18	1x10 <sup>1</sup>	Penicillium	
OTHERS (n=4)										
01	ND	01	03	01	ND	ND	04	NG	NA	
02	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NG	NA	
03	ND	02	ND	02	ND	ND	04	NG	NA	
04	ND	ND	ND	ND	ND	ND	01	NG	NA	
STATISTICS										
Positive samples(%)	01(2.9)	11(32.4)	03(8.8)	05(14.7)	00(NA)	05(17.7)	NA(NA)	11(32.4)	11(32.4)	
Light filth total	13	21	17	11	00	07	67	NA	NA	
	ND	01	02	01	00	01	01	1x10	NA	
Min										
Max	13	03	12	03	00	02	18	3x10	NA	
ND/NG	33	13	17	23	34	27	NA	23	23	

ND: not detected; CFU: colony forming units; total fungi count; NG: no growth; NA: not applicable; LMT: maximum tolerable level (for light filth and fungi)

**Table 3.** Light filth characteristics detected in *aster* eggs and other cocoa (*Theobroma cacao* L.) products commercialized in Florianopolis, their possible contamination risk points and the effects on food / consumers

TYPE #	LIGHT FILTH IMAGE	SAMPLES Positive/total (%)	POSSIBLE CONTAMINATION RISK CRITICAL POINTS						VECTOR OF	LIGHT FILTH EFFECTS ON:	
			COCOA BEAN	PASTE	CHOCOLATE	COMMERCIALIZATION	PACKAGING	STORAGE		FOOD (reduces)	CONSUMER # (causes)
			Field Harvesting	Processing	Re-processing	Storage (°C)	Shelf life				
Insects (whole)		1/34 (3)	NA	NA	NA	NA	A	A	Bacteria /fungi /virus (pathogenic, Sensory characteristic &fungi) <del>toxicogenic</del>	Nutritional value Drymatter	Microorganisms proliferation (bacteria &fungi) Allergies
(fragment)		11/34 (32)	A	A	A	A	NA	NA	Bacteria ** Bacteria / virus (pathogenic, Sensory characteristic &fungi) <del>toxicogenic</del>	Nutritional value Sensory characteristic	Microorganisms proliferation Contact with fungi/moists Allergies
Larvae (live) **		3/34 (9)	NA	NA	NA	NA	A	A	Bacteria Bacteria / virus (pathogenic, Quality/deterioration &fungi) <del>toxicogenic</del>	Drymatter Sensory characteristic Quality/deterioration &Brew)	Bacteria /fungi proliferation
Pupa *** (whole)		5/34 (15)	NA	NA	NA	NA	A	A	Bacteria Bacteria / virus (pathogenic, Sensory characteristic &fungi) <del>toxicogenic</del>	Drymatter Sensory characteristic Quality/deterioration & fermentation)	Bacteria /fungi proliferation
Mites		6/34 (18)	NA	NA	A	A	A	A	Bacteria fungi / virus (deteriorating / pathogenic)	Drymatter Sensory characteristic Quality (deterioration & fermentation)	Allergies

NA: not applicable. A: applicable. \*raw material (cocoa sugar/ fat storage) and their mixing (melting mild temperatures (45-55°C)) applied. \*\*observed prior Wilmar trap bottle (light filth test) \*\*\*moth (*Ephestia kuehniella* L.) metamorphosis stage. #indicator of possible disease

\*Chocolate INSECT: moth bio-cycle timing

(a) 100% cycle: 35-50 days

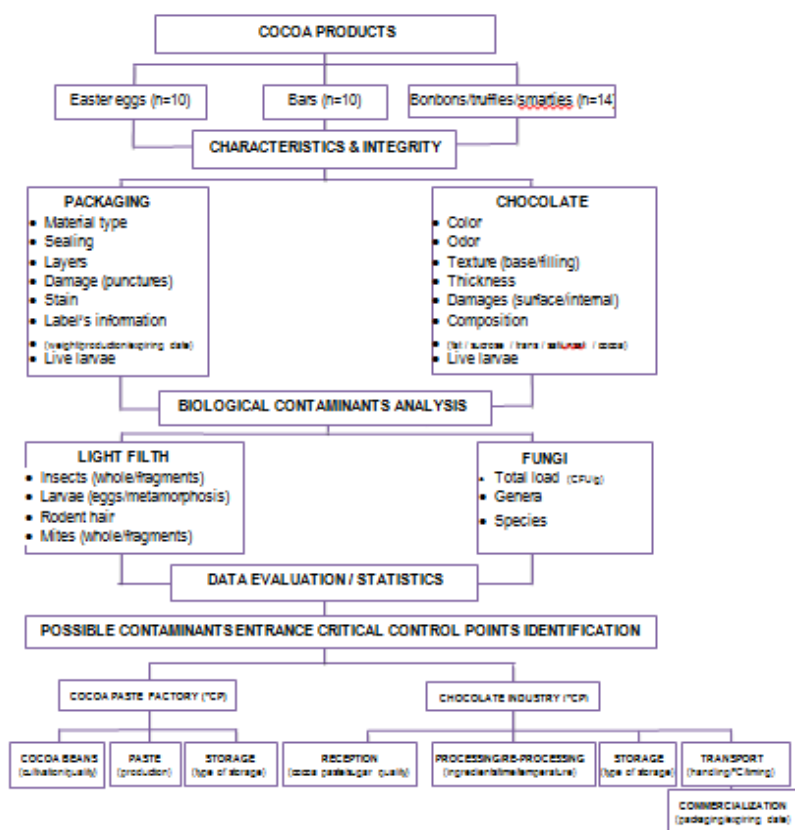
(b) 80% phase: 10-20 days

(c) 60% delivery: 04-07 days (150-300 eggs)

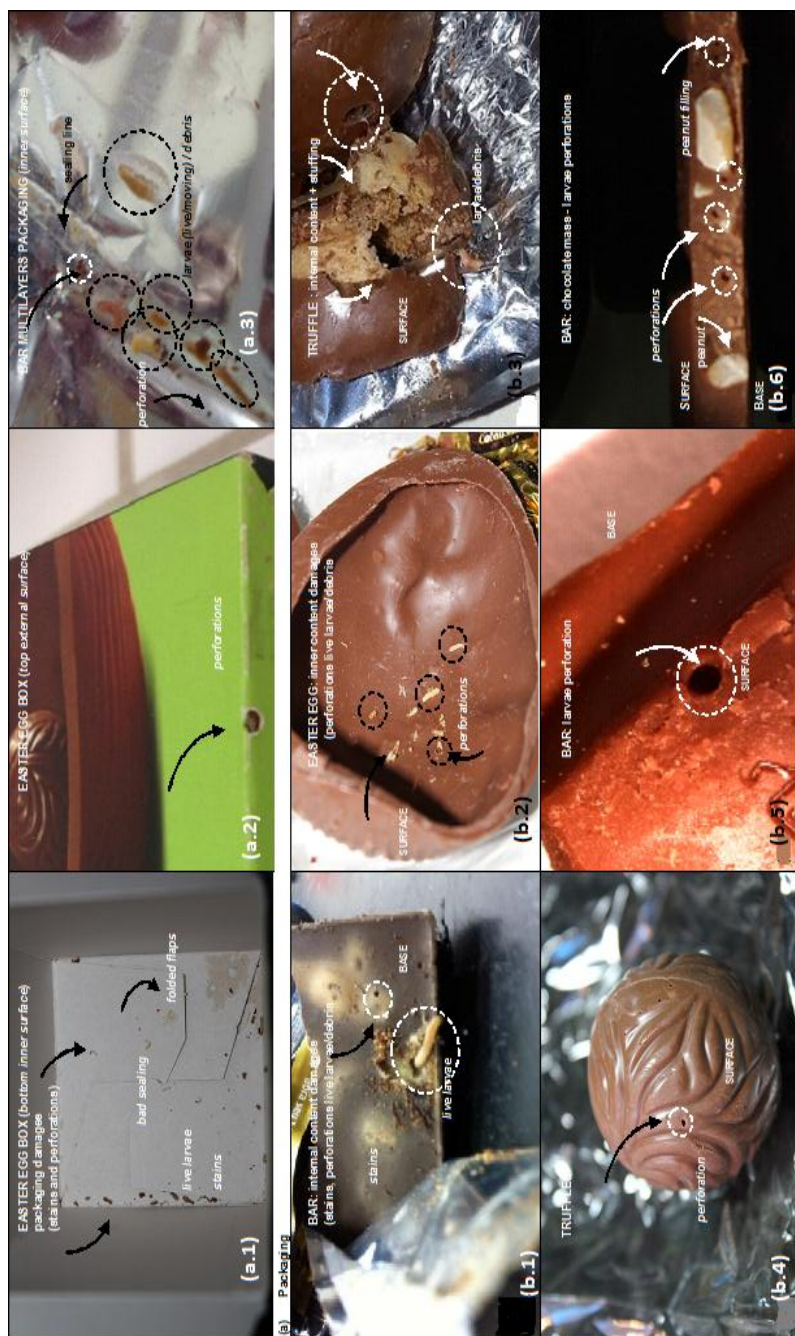
(d) larvae: 4-8 weeks

(e) pupa: 5-10 days (to adult phase reach)

Total time allowed for chocolate products commercialization (shelf life date): the expiration date may be considered for a contractual requirement and a warranty issue stipulated by manufacturer. However, it is not something scientific/biobiological and is only indicative if the product is consumed before that "due date" should ensure their quality and pose no risk to consumer health.

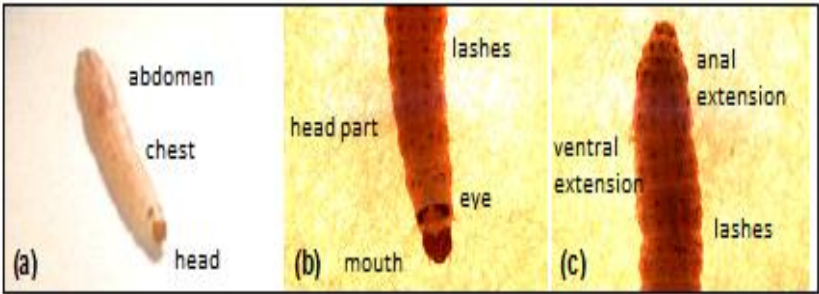


**Figure 1.** Flowchart of biological contaminants evaluation of easter eggs and other cocoa (*Theobroma cacao* L.) products sold in Florianópolis, Southern Brazil, in the period from march 2013 to march 2014 (cp: control point) .



**Figure 2** Biological contaminants macro effect detected on/fin Easter egg and cocoa (*Theobroma cacao* L.) products (a) packaging and (b) internal content.





**Figure 3.** Chocolate moth (*Ephestia elutella*) characteristics at larvae stage isolated from chocolate bar with raisins in the current survey: (a) whole body, (b) head and (c) bottom view (stereoscopy)



### **5 CAPÍTULO 3**

**Controle de condições de armazenamento e processamento de  
amêndoas de cacau (*Theobroma cacao* L.) para a produção de  
chocolates seguros**



**ARTIGO PUBLICADO: Kreibich, H.H., Moecke, E.H., Scussel, V.M.**

**Cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans processing and storage conditions control for safe chocolate products. Proceedings of 11th IWCSPP, 6, 639-650.**

**Cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans processing and storage conditions control for safe chocolate products**

Heloisa H. Kreibich<sup>1</sup>, Elisa H. Moecke<sup>2</sup> and Vildes M. Scussel<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Mycotoxicology and Food Contaminants, Food Science and Technology Department, Center of Agricultural Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil; <sup>2</sup> Laboratory of Microscopy, Food Science and Technology Department, Center of Agricultural Sciences, Federal University of Santa Catarina. Rodovia Admar Gonzaga, n.1346, CEP: 88034-001, Itacorubi, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.

**Abstract**

Cocoa beans can be attacked during cultivation and storage by living organisms (insects: moths / cockroaches; mites; fungi) leading to spoilage/deterioration and they may reach the cocoa mass and be incorporated to chocolate products. Those chocolate contaminants presence including their fragments/larvae/eggs indicate bean exposure to low quality handling and storage. This study evaluated the conditions of cocoa beans from the producing cocoa farms (48) and warehouses (12) located in the Northeastern Brazil (Itabuna-Ilhéus regions - at Bahia state), during five months (March to July 2014). The parameters investigated were *storage facilities*: silos types & material (vertical or horizontal/wooden or metal/with or no thermometry); *environmental conditions exposure*: rain precipitation/relative humidity (RH) / temperatures; *cocoa bean batches*: humidity (moisture content-mc/water activity-a<sub>w</sub>); *living organisms*: insect/fungi toxins and *cocoa bags materials*: raffia/jute/ polyethylene layers. Green methods of prevention/control/decontamination were recommended. From the farms and warehouse storage facilities evaluated, 67 % of them did not have automatic environment, including control settings (i.e., aeration / T°C) and 33% apply high storage technology (control by aeration,

refrigeration). Regarding external and internal warehouse conditions of RH and temperatures, they reached mean of 75%(min 60; 90 max) and 25°C(20 min; 35max), respectively. Bags insect proliferation and fungi spoilage were registered at different degrees, (50% of the warehouse evaluated) leading to part of stored bags discarding for Premium beans Type. Application of controlled atmospheres (vacuum/ozon/hermeticity, through cocoon in-container for export) was recommended and improvement of bags material and thermometry inclusion in some of the facilities too. That will be the next steps of the Cocoa Project.

**Key-words:** Cocoa, *Theobroma cacao*, light filth, storage, chocolate, insects, fungi control.

## 1. Introduction

The early stages of cocoa bean processing are carried out in the cocoa farms, in which the characteristic chocolate flavor starts to develop. The post-harvest cocoa beans technology depends on the Type of cocoa batches to be sold for chocolate making. Whether they are of quality (a) *Premium* (selected cocoa varieties – i.e., beans with high standard of tissue structure and characteristic aroma); (b) *Commercial* (beans of not highly controlled standards and sensory quality) or (c) *For export* (beans that flavor is not considered the most important contributors, usually utilized for formulation and cookery) (Ceplac, 2014; Icco, 2014). After cocoa fruits are harvested, their seeds have the surrounding pulp extracted and sent to natural fermentation by yeast and bacteria. That process causes beans swelling and brownish color development (enzymes reaction on polyphenols content as pH reduces) and moisture content (mc) is high - ca. 60% (Ribeiro, 1996; Barel, 1997; Nachtigall, 1999). From that stage, the seeds are called beans (no germination capacity) and are sent to sun drying on cement platforms (mc: around 7.5%) (Hii et al, 2006; Efraim, 2009; Kreibich et al, 2014). Next, they are packaged in bags and sold for the internal market or exported. Despite those actions, difficulties maybe be faced which need to be controlled, such as, fungi proliferation due to climatic factors (rain/heat: high moisture/temperatures) that can lead to production losses up to 40% (Faleiro et al, 2004; Rubini et al, 2005; Mounjouenpou et al, 2008).

The presence of biological contaminants (insects / mites / rodents hair / fungi) in the final product (chocolate) is indication of lack

of hygienic-sanitary control during the phases involving its production - from cocoa fruits (raw material) cultivation (harvest / transport), seed to bean transformation (fermentation / drying / storage / packaging) and selection / segregation at the industry reception for cocoa paste transformation (handling / processing / packaging) including to the final product (processing / storage / transport) (Ribeiro, 1996; Nachtigall, 1999; Copetti et al, 2011).

These contaminants are important carries of microorganisms (fungi, bacteria, viruses) and of their metabolites - toxins (Scussel et al, 2011; Koerich de Souza, 2013; Kreibich et al, 2014; Savi, et al 2014). In addition, mites, which develop in stored products (especially those with high fat / protein content) can trigger allergic reactions and inappropriate packaging with improper storage conditions can enable them passing to the final product, including external odors (Lorini, 2002).

The official cocoa classification for export of the Brazilian Agriculture Ministry Regulation number 161/88, establishes standards for cocoa produced in the country as follows. *Type I*: fermented dry beans, maximum mc of 8%, characteristic aroma, no strange odors, free from foreign material, containing up to 110 beans/100 g, with some tolerated defects (mildewed, flattened & slates beans) up to 2% and insects up to 3%) and *Type II* (apart from being also fermented dry beans, with 8% mc, characteristic aroma, no strange odors, free from foreign material, containing up to 110 beans/100 g, with tolerable defects including moldy beans at a maximum of 2%, insects presence to a max of 6% and flattened beans max. 3% (FAO, 2014).

Considering the importance that cocoa beans and the chocolate production play in the national and international trade, this paper aims to evaluate the safety of cocoa bean from the Itabuna-Ilheus region of Bahia, northeastern Brazil. The focus on their (a) processing steps (fruit seed extraction / fermentation / drying / handling) and (b) storage facilities *versus* their exposure to environmental conditions. In order to identify / possible contaminants and recommend improvements.

## **2. Materials and Methods**

### *2.1. Material*

*2.1.1. Samples:* cocoa fruits and dry beans (60) of *Premium*, *Commercial* and *For export* Types (24, 30 and 06, respectively), from the 2014 harvest season (March / July). They were from different cocoa

producers farms (48) and warehouses (12) located in the Itabuna-Ilheus region Bahia state, Northeastern Brazil (Figures 1 / 2).

*2.1.2. Farms and warehouses:* (a) *farms* - different buildings, including reception, processing area i.e., the fruit treatment (cut / cleaning) and seed extraction (separation from pulp) fermentation room / drying areas and storage facilities (primary); (b) *warehouses* - (b.1) *secondary storage* - average storage capacity (185 bags / 60 kg) for 30 days in austere conditions and control of hygiene and food safety; (b.2) *central storage* - with different buildings including dry beans bags reception, analysis of cocoa classification and large storage space with capacity for 945 to 23000 bags (60 Kg each).

*2.1.3. Equipment:* (a) *cocoa seed extraction* - knives, wooden boxes (2 x 2 m width x height, respectively); (b) *fermentation* – wood and stainless steel fermentators (10 m<sup>3</sup>) (with temperature control); (c) *drying* - cement platforms, electric ovens and hot air dryers (tubular); (d) *packaging* - bag packaging machine; (e) *storage* - scales, sieves (10 x 20 mm, width x length), sample collector (*calador*), impurities separator, waste/dust removal cleaners, conveyor belts, refrigeration equipment, moisture analyzer and mill.

*2.1.4. Other materials:* packaging material such as raffia (a synthetic material that mimics the polypropylene fiber), jute (*Corchorus capsularis* - a vegetable fiber with textile extraction), cotton (a textile, soft and hydrophilic, vegetable fiber), dimensions of 700 x 550 mm for height and width, respectively.



**Figure1.** Cocoa (*Theobroma cacao* L.) (a) mature fruits and (b) beans (post-fermentation) drying steps from the Brazilian state of Bahia.

## 2.2. Methods

**2.2.1. Sampling:** cocoa beans (60) were collected from batches of farms (48) and warehouses (12), from the following cities (17) from the Brazilian state of Bahia (Figure 2). They were collected from piled bags (500 g portions) utilizing cocoa sampling collector. After that, they were sent to the Food Microscopy and to the Mycotoxicology Food Contaminants laboratories at the UFSC to carry out the investigation on the: presence of living organisms (rodents / insect / mites / fungi) toxins, and humidity (mc / water activity -  $a_w$ ).

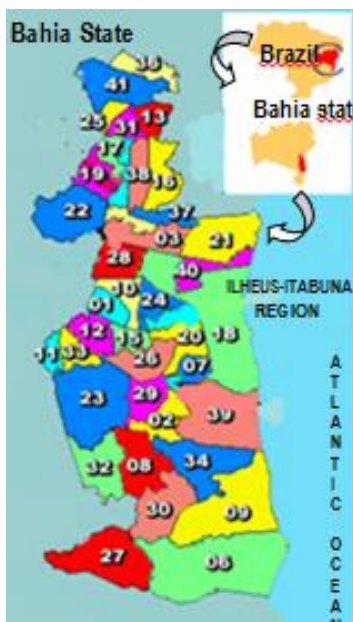
**2.2.2. Cocoa bean processing conditions:** the whole processing steps were evaluated i.e., from the (a) *cocoa fruits seed extraction* - fruits (harvested mature) after cracked open and the seed separation from mucilaginous pulp (if insect/fungi infested); (b) *fermentation* - seeds to beans (no germination capacity) formation through bacteria fermentation (no fungi growth of which produce unpleasant taste or toxins - harmful to health); (c) *drying* - at this step, different technologies could be applied depending on the producer facilities / (mc/fungi evaluated) from sun light to hot air drier) and (d) *cocoa bags packaging* - whether carried out utilizing adequate/clean bags (capacity: 60 kg), proper material Type with jute / polyethylene / raffia or cotton, in different layers (impurities free) (Nachtigall, 1999; Hii et al, 2006; Efraim, 2008; Copetti, 2011).

**2.2.3. Storage evaluation:** (a) *facilities* - the farms (primary storage) & warehouses (secondary and central storages) were evaluated for type of construction (vertical / horizontal stores), material (wooden / metal),

whether they had temperature control (windows / thermometry cables) and aeration (equipment for regular air / with refrigeration). Also whether the facilities had procedures for areas dust cleaning, and rodents/insects/mites or other vectors control; (b) *environmental conditions* - (b.1) *internal*: type of ventilation (natural / fan / refrigeration / other gases) time and Type of mc control (b.2) *external* - registration charts of daily/hour temperature variation (average/maximum/minimum), relative humidity (RH) and rain precipitation of the sampling storage site. Storage average time, usually for a period of 30 to 90 days.

2.2.4. *Living organisms possible presence in beans facilities*: both, infestation and detection were evaluated (a) *infestation* - insect intrance/location was investigated throughout the whole process (at fruits opening / seed separation / during fermentation / drying / storage / packaging). Either, their presence indication of living organisms (rodents / hair / insect / egg / larvae / moth/fungi) and possible damage caused to cocoa beans. Also how the beans/bags were handled (whether loose - on the floor or in bags - on piled/ pallets, also if close or far from the walls) and (b) *detection* - the living organisms presence/detection was investigated by checking through stereo microscopy the chracteristic details by at different amplifications (beans damages by rodent / insects broken & fungi spoilage (Scussel et al, 2014).





**Figure 2.** Itabuna-Ilheus cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) producing region with its 46 sample collection sites at Bahia state, Brazil.

### 3 Results and Discussion

The evaluation of the whole cocoa bean production (seed fruit detaching ➡ fermentation ➡ drying ➡ bean bags storage) heady for chipping / commercialization, showed some points (mainly, at packaging and storage) of living organisms entrance/development that should be controlled/destroyed in order to avoid safety problems and solution were recomend. Tables 1 & 2 and Figs 1 to 6 show samples characteristics, the processing and storage facilities, as well as avironment conditions that could influence development of insects and fungi.

#### 3.1 Cocoa bean processing conditions

It was observed that the main cocoa bean processing steps of were similar among the different beans producers of Bahia satate main cocoa region differing on some paraters applied. Producers harvest the fruits fully ripen and healthy and use select (specific) variety (Criolo).

Most of them also inspect fruits for lesions or fungi injuries prior and after washing.

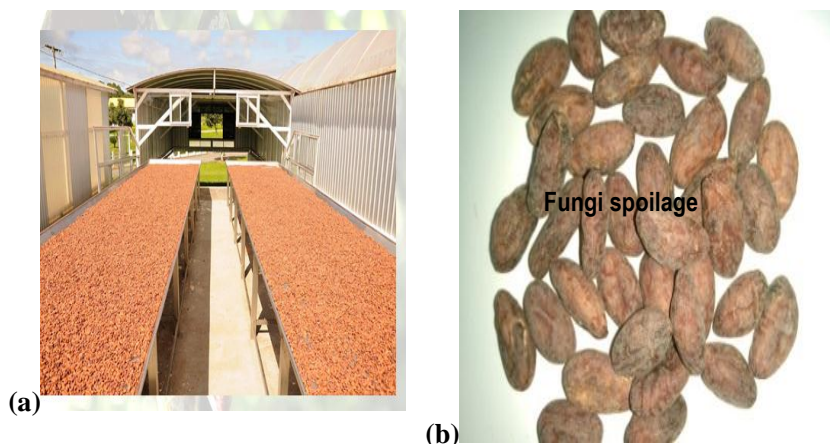
(a) *cocoa fruits seed extraction* - at the fruits opening (stainless steel knives) by trained staff and seeds extrated (they also remove impirities (shell fragments / placenta / defective or germinated seeds). Also seeds are inspected for insects/fungi injuries which can interfere on the next step - the fermentation.

(b) *fermentation* – at this step beans swell and turn into brown color as pH reduces. That process changes the beans characteristics and the precursors of desired flavor are produced. At the end of fermentation, the beans mc is high and ranges from 50 to 60% (Oetterer et al, 2006)

(c) *drying*: as expected, in the drying process, the mc reduces to 7-8% and so the acidity (providing continuation of the chemical and biochemical transformations within the beans) (Lacey, 1991; Beckett, 2008). The drying process is carryed out in different sites and/or equipments: (a) sun (b) electric and (c) hot air dryers reaching a maximun temperature of 55°C allowing slow moisture release/evaporation. Regarding wood combustion/heat source driers, if smoke gets in contact with the beans, it can happen contamination by poliunsaturated aromatic hydrocarbons - PAHs (smoke produced and are carcinogenic). Figure 3 shows covered, on tables (far from soil contact), safe drying although under the sun. As the post-harvest technology applied to cocoa bean depend upon the Type to be sold (*Premium / Commercial / For export*), the cultivation process, the fermentation type and the drying process applied also greatly influences the final flavor and cocoa Type. Many Brazilian farmers use firewood dryers, which provide smoke flavor to cocoa beans. That means PAHs (carcinogen contaminants) which are rejected by some export market. Regarting hygienic, from the 48 farms studied, 35 (73%) of them were commercial farms producing cocoa in conditions often bad with some lack both, of hygiene and good storage practices.

(d) *packaging* - in the different farms and warehouses, cocoa beans were stored, either in raffia, juta or other porous (to enable air exchange) material bags. Bags should be clean, free of odors. According to Decree n. 6268 (MAPA, 2007) that established the Technical Regulation for cocoa beans, the bags used in packaging should be of appropriate materials and specifications. The bagged samples must be stored in containers with screens to allow breathing and beans protection against insect infestation. The mesh size of the screen must be small enough to prevent the entry of moths and larvae. Beans for export are

packaged in 60 kg bags and Ceplac issues a report according to the classification Type and also a certificate accordingly (Ceplac, 2014).



**Figure 3.** Cocoa beans (a) under proper sun drying procedure with protection (wall, covered ceiling, far from soil/floor contact) and (b) improper drying / high humidity allowing fungi proliferation.

### 3.2 Cocoa bean farm & warehouse storage

Several cocoa warehouses (secondary & central storages) are located in cities near the producing cocoa farms (primary storage) (Figure 4). As soon as the bean bags reach the warehouse they are weighed and quality checked (flavor, mc, damages, spoilage), prior being piled up onto pallets for storage. For trade, they are transported on trucks either on trucks to the harbours for shipping (export) or distributed into the internal market. The USA market is the largest Brazilian cocoa consumer.

(a) *Facilities* – the storage facilities of the Itabuna-Iheus region, have quite broad differences. Although some of them could allow humidity/moisture absorption thus worsen the quality for export, other storage facilities had floor and brick walls covered with wood to reduce indoor humidity; availability of ventilation windows (facing the direction of prevailing winds) and protected by fine-mesh screens (to prevent insects entry); excellent sealing (to prevent entry rodents). Some facilities have dimensions varying with length, width and walls height minimum of 9, 7 and 2 m, respectively (Almeida et al, 2001).

(b) *Conditions* - dry cocoa beans are hygroscopic, so they absorb moisture from the environment under high humidity conditions

(FDA, 2014). It is recommended a maximum of 2 to 3 months storage when in tropical countries conditions, to avoid too much exposure to environment high temperatures and umidities. If storage is longer, humidity should be strictly controlled, i.e., cocoa beans mc should be periodically checked and kept below 8% (CAC, 2013), which is carried out by the Itabuna-Ilheus region most producers. In addition, the use of silo bags - cocoon in containers have been tested to inhibit the development of filamentous fungi mycotoxin producers during shipping. The storage performed on these farms has been carried out under air-conditioned (at 21 to 24°C). In that condition, their acidity decreases and keeps beans indefinitely conserved (from mc inicial: 50-60 %; to final: 7-8%).

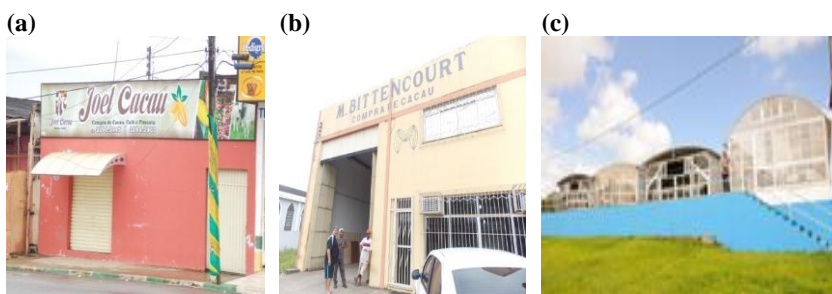


Figure 4. Cocoa beans warehouse facilities: (a) Primary storage, (b) Intermediary and (c) Central storage unit at Bahia state.

(b.1) internal - from the 12 storage facilities visited, 33% (4) were considered suitable for beans storage. The warehouses initially assess the cocoa beans mc coming from farms (which can not exceed 9% - otherwise they are rejected, or the price reduces). Samples with smoke odor also have reduced price. The temperature of the warehouse is controlled by air ventilation and the bags are distributed above the pallets to prevent contact with the warehouse floor and walls. *Pre-cleaning* – when cocoa beans are received (bags), they are submitted to pre-cleaning process, through a three-stages sieve for impurities separation such as cocoa husks, sand and insects. The cocoa bean separated fraction then goes to the vacuum system to remove large and light density impurities such as pieces of bark, insect and strings, followed by passing through a magnetic and stones separators (Figure 5.b.2).

(b.2) external – although most of the cities in the South coast of Bahia has a humid tropical climate with average annual rainfall

between 2000 and 2400 mm (well distributed throughout the year) summer is the period of higher precipitation. The annual temperature average is of 24.7 °C, and in the winter period goes down only up to 21 °C (Table 1). Only 4 of the 12 stores visited (33%) warehouses had control temperature, using air conditioning, in addition to controlling the RH. The Ceplac is responsible for providing technical assistance for the construction of warehouses. This assistance teaches how to control the attack of insects and rodents, how to maintain a good level of hygiene, such as exterminating pests and how to control humidity and temperature. From the data presented, most of the cocoa beans could be contaminated by mycotoxins either fungi can grow (a) as pathogens in fruit during in the field pre-harvest period or in the (b) post-harvest period. These toxigenic fungi can produce mycotoxins under favorable conditions (high temperature and humidity) as observed in some of the facilities cocoa beans of this study (Table 1).

**Table 1.** Itabuna-Ilheus region climate parameters obtained during the cocoa bean study (2014 season)<sup>a</sup>

Parameter	Month			
	March	April	May	July
Temperature(°C)				
Average	25.9	25.3	24.1	22.7
<sup>b</sup> min.	22.4	21.8	20.9	19.7
<sup>c</sup> max.	29.4	28.7	27.5	26.4
Humidity				
Rain (mm)	216.9	204.7	144.5	200.6
RH <sup>d</sup> (%)	80.7	81.5	83.0	85.7
Days with rain	17	15	14	16
Sun light				
Hours sunshine	235.9	203.4	199.8	191.3
March-July <sup>b</sup> minimum	<sup>c</sup> maximum	<sup>d</sup> relative humidity	(National Institute of Meteorology, 2014)	
			191.3	197.7

### **3.3. *Living organisms versus cocoa beans whole process & storage points***

Foreign materials and / or impurities present in cocoa beans batches and in their storage environment surroundings can be responsible for whole batch deterioration as they can favor rodent / insects (egg/larvae) / mites / fungi proliferation. Also cocoa beans mechanical or biological damages can occur due to insects and rodents attack which promote moisture absorption and facilitate fungi invasion / to the highly nutritious inner cocoa bean, leading to rapid development of fungi and, consequently, to increased production of mycotoxins (Scussel, 2002). (a) *Infestation intrance / location* - possible living organism presence and their entrance sites were investigated throughout the whole process (fruits opening / seed separation / fermentation / drying / packaging /storage). Also how the beans and bags were handled (either loose on the floor or in bags on piled / pallets, close or far from the walls) which could allow them to hide/grow and as expected the main sites were close to the dispersing beans unities were found , also wrere dust was accumulated. (b) *Detection* - most of the farms segregate spoiled/damaged beans and also check for possible living organisms detection, however we also checked their presence and beans damages produced through stereoscopy, and Figure 5 shows some testae damage / fungi / mites proliferation, difficult to see by naked eye.

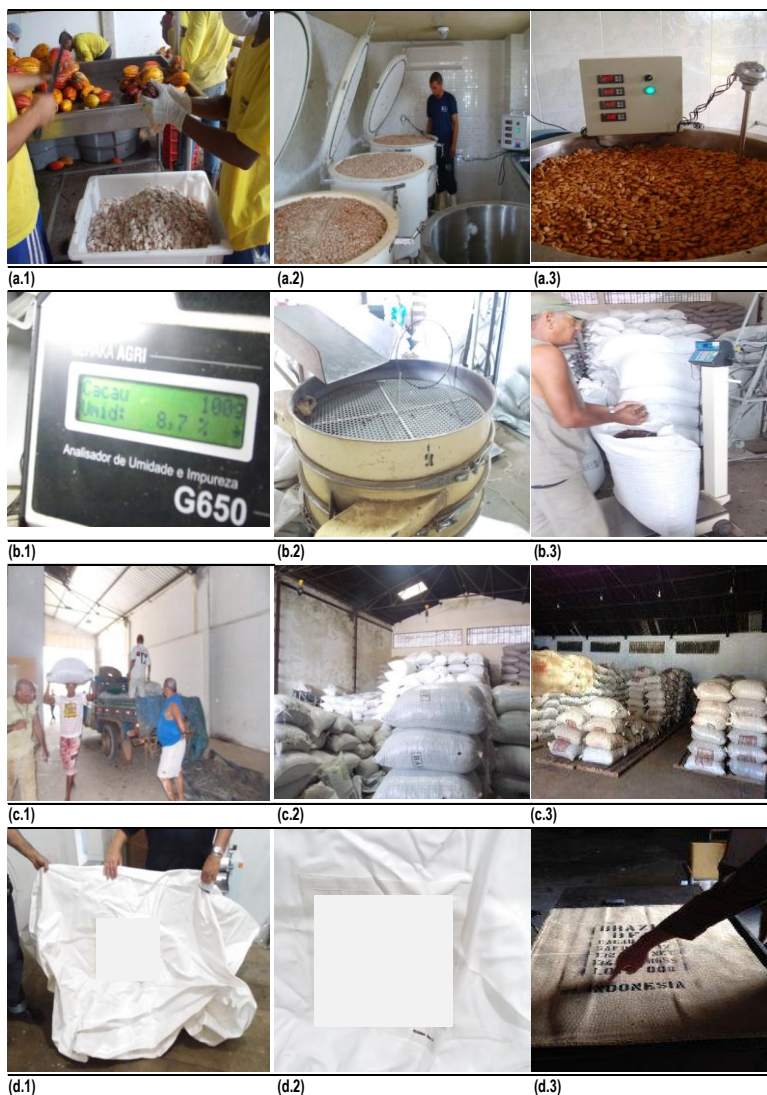
### **3.4. Cocoa bean batches**

The aw of cocoa beans after drying should not exceed 0.7 to maintain quality and avoid fungal growth and mycotoxin production, besides indicated the chemical and physical stability if they are stored well. The mc of cocoa beans is reduced from 60-65% to 7-8% in the drying step. Some stores come to receive beans with higher mc however it this case need to proceed to another drying step to keep bean safe (Ephraim, 2009). Based on these results samples (60) evaluated had  $a_w$  varying from 0.5964 to 0.8521 and 30 samples (50%) had higher  $a_w$  levels (0.7117 to 0.8521), still on the safe side. Higher than that will be favorable for toxin production by toxigenic fungi in the samples. There was also mc changes from 4.72 to 13.57% respectively in some of the storage evaluated. A total of 23 samples had high mc (8.28 to 13.57%), thus favorable conditions for fungi development. Studies have reported toxigenic fungal species (*A. flavus* and *A. niger*), in dried cocoa beans from different growing areas and countries (Aroyeun et al., 2007;

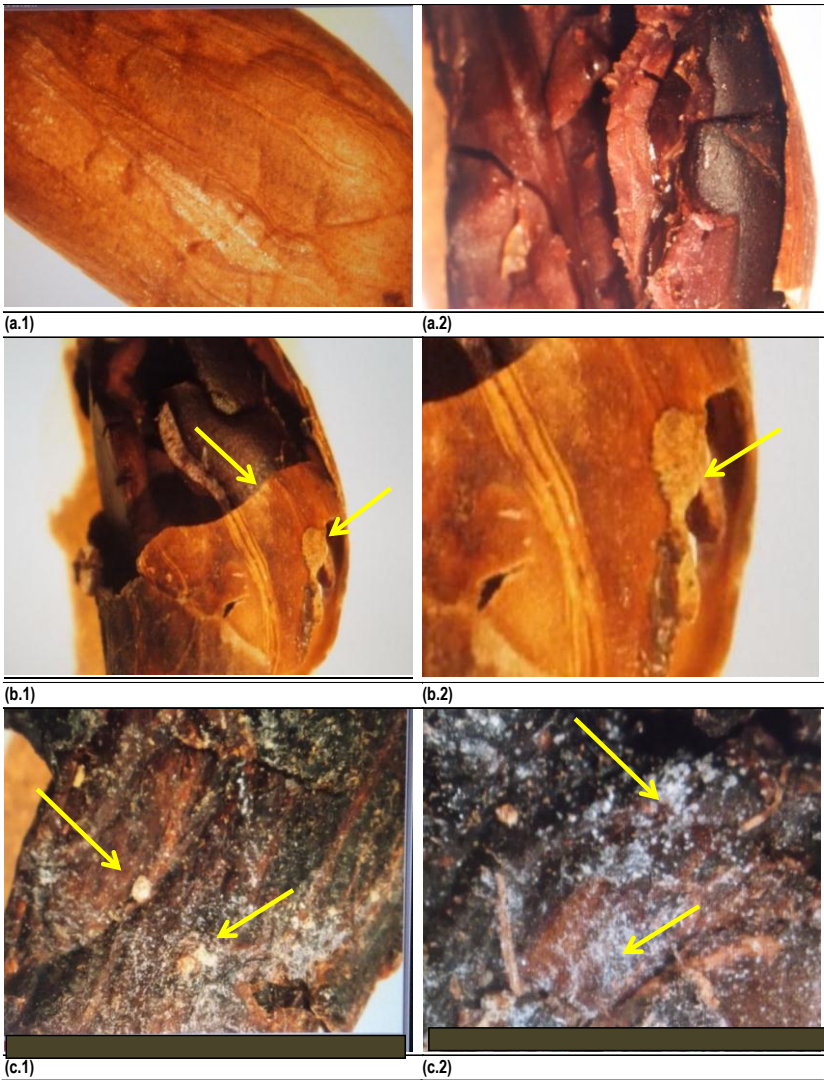
Mounjouenpou et al., 2008; Sanchez-Hervas et al., 2008; Copetti et al., 2011). From the visited 48 farms, 26 of them (54.2%) had production of cocoa Type I and II. Despite the superior quality required Type III (for export), most of its production stays in the domestic market due to high Brazilian chocolate production/consumption.

*Recommendation:* as fumigation is an effective insecticide treatment and not quite simple to apply, that procedure/step depends on the cocoa bean buyers to decide application. It may be carried out in the warehouses or in the cocoa own containers. Fumigation, which consists on distributing tablets (2 cm diameter) beneath the sacks (for as long as 20 sec). The amount is calculated per m<sup>2</sup> bags. After this step, the beans are covered with a canvas sheet during 72 hs after it can be removed and the gases vented off to the air. Other methods of insect/fungi control could be also by applying modified atmosphere (carbon dioxide, ozone), keep hermetic or sealed (as long as innovative facilities - no air entrance are adopted/developed) and so also preserving the contact with environment moist.





**Figure 5.** Cocoa beans (a) inicial processing steps (a.1) seed fruit separation: (a.2) fermentation site / air-conditioned environment, (a.3) final fermentation step / temperature control (21 and 24°C); (b) classification equipment: (c.1) humidity control meter, (c.2) three-stages sieves -cleaning/waste/size, (c.3) scales; (d) material applied for bags cocoa on storage: (d.1) hermetic storage, (d.2) closer view, (d.3) jute bag.



**Figure 6.** Stereo micrographs of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.): (a) *Premium Type* [(a.1) intact *shell* / (a.2) cracked endosperm]; (b) *damaged shell* [(b.1) mechanic / (b.2) by insect]; (c) *spoilage* [(c.1) mites and fungi / (c.2) fungi colonies]. 40 and 150 x.

**Table 2.** Cocoa farms (primary) & warehouses (intermediate & central) storage characteristics

Storage			Cocoa bean		Drying process		Whole cocoa bean production	
Type	Capacity (bags*Kg)	Size (m <sup>2</sup> )	Conditions	Time (days)	Type	Selection		Heat °C
I - COCOA FARM* (primary n=48)								
185 (11.100)	100	Cement platform	No rodents control	30	Premium	Premium type	Sun	Fruits harvesting
		No rodents control	control		Commercial	Cocoa Export	Oven	Breaking of fruits
		Basic storage		Export				Fermentation
II - WAREHOUSE (intermediate n=9)								
945 (56.700)	300	Cement platform			Premium	High moisture		Reception
		Bags on pallets			Commercial	Fungi spoilage	NA**	Selection
		Storage devices		30-40	Export	Color alteration	NA	Weighing
		No rodent & dust control (10%)				Bad odors	Screening	
						Light filths	Storage	
III - WAREHOUSE (central n=3)								
23.000 (1.380.000)	1.500	Cement platform			Premium	High moisture		Reception
		Bags on pallets			Commercial	Fungi spoilage	NA	Selection
		Storage devices (100%)		90	Export	Color alteration	NA	Weighing
		Windows with screens(100%)				Bad odors	Screening	
		Controlled atmosphere (30%)				Light filths	Storage/shipping	

\* 60 kg \*\* not applicable

## 4 Conclusion

The whole cocoa bean production (from the different producers of Itabuna-Ilheus region) showed some points (mainly, at packaging and storage) of living organisms entrance/proliferation that should be controlled in order to avoid safety/quality problems for final product (either cocoa beans, paste or chocolate).

A constant concern on maintaining the quality of cocoa to ensure the best processing conditions, storage and of their final products should be a goal to be achieved in the short term. In addition to a program of sustainable agriculture, living organisms contamination of raw materials (fruits/seeds) through crop conservation methods and control (traps/fumigation/control atmospheres). That will result in the reliability and safety of the end buyer, adding value to the commercial product, enabling the national, international and export economy, as well as reducing losses due to low quality products.

From the visited farms (48), only 13 farms (27%) produce premium cocoa. The whole process is important as the varieties utilized to get the following characteristics - beans have a fruity, flowering, wooden and/or nut aroma (from the Criollo and Trinitario varieties) whose aroma influence depends on the steps from fruit harvesting to the processing final stages.

## Acknowledgements

Authors thank the CEPLAC, located at Ilheus city, Bahia state, for the support on the cocoa farms and warehouses in the access and data collection as well as for CAPES /CNPQ for the H.K. grant all technical support.

## References

- Almeida, F.A., Mascarenhas, G.C., Midlej, R.R., 2001. Estudo da Cadeia Agroindustrial do Cacau. In: Vieira, Rita de Cássia Milagres Teixeira et al., Cadeias produtivas no Brasil: análise da competitividade. Brasília, FGV/EMBRAPA, p. 109-135.
- Aroyeun, S.O., Adegoke, G.O., Varga, J., Kocsube, S., Pal, K., Vagvolgyi, C., 2007. Effect of fermentation and storage on mycotoxigenic fungi, ochratoxin A and AFB1 in cocoa beans from Southwestern Nigeria. *Malaysian Cocoa Journal* 3, 35–46.

Barel, M., 1997. Fermentation of cocoa: the way of its estimation and control. *Revue Des Industries Alimentaires et Agricoles*, 14, 211-214.

Beckett, S.T., 2008. The science of chocolate, second ed. Royal Society of Chemistry Paperbacks, Londres (Chapter 3).

Beuchat, L.R., 1987. Influence of water activity on sporulation, germination, outgrowth, and toxin production. In: Rockland, L.D., Beuchat, L.R. (Eds.), *Water activity: the oryand applications to food*. Marcel Dekker, New York, pp. 153-172.

Efraim, P., 2009. Contribution to quality improvement of cocoa in Brazil, through the characterization of oil– resistant broom – witch and seeds damaged by fungus cultivars. Thesis (PhD in Food Technology). Faculty of Food Engineering, Campinas University.

Faleiro, F.G., Niella G.R., Cerqueira, A.R.R.N., 2004. Damaceno V. O.; Gomes L. M.C.; Faleiro A. S.G. Produção de Micélio de *Crinipellis pernicioso* em Quatro Meios de Cultura, Visando Extração de DNA. *Revista Fitopatologia Brasileira*, n. 29.

Hii, C.L., Rahman, R.A., Jinap, S., Che Man, Y.B., 2006. Quality of cocoa beans dried using a direct solar dryer at different loadings. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86, 1237-1243.

Koerich, K.S., Tonon, K.M., Scussel, V.M., 2013. Labels layout of cats and dogs food sold in Brazil and their national regulation adequacy. *Cienc.Rural (UFSM.Impresso)* 43, 366369.

Kreibich, H.H., Savi, G.D., Moecke, E., Scussell, V.M., 2014. Easter eggs and other cocoa (*Theobroma cacao* L.) products quality: insects, mites, fungi and packaging versus critical control points. *International Journal of Applied Science and Technology*, 4-5.

Lacey J., Magan, N., 1991. Fungi colonising cereal grain: The occurrence and water and temperature relationships. In Chlkowski J (eds.) *Cereal grain –Mycotoxins, Fungi and Quality in Storage*, Elsevier, Amsterdam, pp 77-118.

Lima, E.D.P.A., Pastore, G.M., Barberty, S.D.F., Garcia, N.H.P., de Brito, E.S., Lima, C.A.A., 2008. Obtenção e utilização de enzima polifenoxidase extraída de polpa de pinha madura no melhoramento do sabor de cacau. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 23, 709-713.

Nachtigall, A.M., 1999. Processamento de chocolate. Bacharelado em Química de Alimentos, 25 pag. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Oetterer, M., Regitano-D'arce, M.A.B., Spoto, M.H.F., 2006. Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Barueri – São Paulo: Manole, p.1-48.

Ribeiro, N.C.A., Bezerra, J.L., Lopez, A., 1986. Micobiota na fermentação do cacau no estado da Bahia, Brasil. *Revista Theobroma* 16- 47.

Rubini, M.R., Silva-Ribeiro, R.T., Pomella, A.W.V., Maki, C.S., Araújo, W.L., Santos, D.R., Azevedo, J.L., 2005. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis perniciosa*, causal agent of Witches' Broom Disease. *International Journal Biological Science* 1, 24–33.

Sánchez-Hervás, M., Gil, J.V., Bisbal, F., Ramón, D., Martínez-Culebras, P.V., 2008. Mycobiota and mycotoxin producing fungi from cocoa beans. *International journal of food microbiology* 125, 36–40.

Savi, G.D., Scussel, V.M., 2014. Effects of Ozone Gas Exposure on Toxigenic Fungi Species from *Fusarium*, *Aspergillus* and *Penicillium* genera. *Ozone Science & Engineering*, 36, 144-152.

Scussel, V.M., 2002. Fungos em grãos armazenados. In: Lorini, I.; Miike, L. H.; Scussel, V. M. Armazenagem de grãos. Campinas: Biogeneziz, p. 675-691.

Scussel, V.M., Giordano, B.N., Simao, V., Manfio, D., Galvao, S., Rodrigues, M.N.F., 2011. Effect of Oxygen-Reducing Atmospheres on the Safety of Packaged Shelled Brazil Nuts during storage. *International Journal of Analytical Chemistry* 2011, 1-9.

## **CAPÍTULO 4**

**Descontaminação pelo gás ozônio de amêndoas de cacau  
(*Theobroma cacao* L.) inoculadas com *Aspergillus flavus***





**ARTIGO SUBMETIDO: Kreibich, H.H., Christ, D. Silva, J., Savi, G.D., Scussel, V.M. Decontamination of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) inoculated with *Aspergillus flavus* by ozone gas Journal Ozone: Science & Engineering**

**Decontamination of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) inoculated with *Aspergillus flavus* by ozone gas**

Heloisa H. Kreibich<sup>1</sup>, Divair Christ<sup>2</sup>, Juliana Silva<sup>1</sup>, Geovana D. Savi<sup>1</sup> and Vildes M. Scussel<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Mycotoxicology and Food Contaminants, Food Science and Technology Department, Center of Agricultural Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianopolis, Brazil; <sup>2</sup>Storage Laboratory and Prototypes Drying Facilities, Technological and Exact Sciences Center, Western Paraná State University, Cascavel, PR, Brazil.

**Abstrat**

The ozone (O<sub>3</sub>) gas antifungal properties on *Aspergillus flavus* strain inoculated in dry cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) was investigated by applying a factorial design (2<sup>2</sup>),utilizing gas concentrations of 20/40/60 µmol/mol, time of exposure of 30/105/180 min and 30 days storage. Trials were carried out into two main cocoa Groups (*Control*: C and *O<sub>3</sub>Treated*: I, II and III for each gas concentration, respectively).The O<sub>3</sub> gas was applied into the silos through an inlet aperture, left standing inside the silos (for 3 lengths of exposure time) and then cocoa portions had the gas antifungal efficiency, humidity and lipid stability variation measured (both, just after application at Day zero and after 30 days of storage). As expected, it was observed (with the increasing of the O<sub>3</sub> concentration – Group I to III) a fungi reduction as the gas exposure time increased. The response surface showed a 88% *A. flavus* spores inhibition of immediately after the maximum gas concentration and time of exposure reached cocoa beans, followed by total inhibition as the time of storage increased (when compared to Group C).The cocoa moisture content (previous 6.9%) reduced after treatment (6.2%), and slightly increased at the end of the storage and the O<sub>3</sub> gas conditions showed no cocoa bean lipid oxidation during the storage period. Under the current study conditions, the most effective treatment was from

Group III (60  $\mu\text{mol/mol}$  concentration) at the longer  $\text{O}_3$  exposure (180 min), as the response surface presented 100% *A. flavus* spores inhibition.

**Keywords:** Ozone gas, Contamination, *Aspergillus flavus*, Cocoa, *Theobroma cacao*

## INTRODUCTION

The application of cocoa bean (*Theobroma cacao* L.) cultivation, harvesting and storage good agricultural practices is important to improve its composition and so the cocoa paste and chocolate sensory quality. Cocoa trees are grown in very warm & humid tropical climates (West Africa, Asia, South and Central America), environment that allow their proper growth and development of desirable fruit/seed composition. However, those conditions (high temperature and humidity) may lead to spoilage and toxigenic fungi growth (Ostovar and Keeney 1973; Schwan and Wheals 2004; Kreibich et al. 2014, 2015a, b).

The main challenges in the chocolate industry to develop a good quality and safe product are, apart from the cocoa processing control (fermentation /drying/roasting) to avoid storage synergistic interactions(undesirable flavor development); the spoilage & toxigenic fungi growth control (Wilson and Payne 1994; Ribeiro et al. 1986; Ardhana and Fleet 2003; Mounjouenpou et al. 2008; Sanchez- Hervas et al. 2008; Copetti et al. 2010). Studies have been carried out to develop actions and procedures for fungi control and/or their decontamination (destruction / inactivation) mainly in the first stages of production (cocoa bean and/or paste)(Codex Alimentarius Commission 2013; Mounjouenpou et al. 2008; Copetti et al. 2010).

Apart from their deteriorative influence and consequent sensory quality reduction of cocoa bean and chocolate, the presence of toxigenic fungi strains is also of health concern (regarding toxins formation). *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium* are the main genera producing toxic secondary metabolites in food–mycotoxins. Several of them are mutagenic, teratogenic, and carcinogenic in humans and animals (IARC 1993; Scussel 2002, 2004).

Any detoxification strategies, that aim to remove them (fungi and toxins) in the earlier processing stages without compromising the food nutritional quality, are important and necessary its application (Leung et al. 2006).

Decontamination methods that apply heat (sterilization) can cause the development of undesirable compounds, nutrient loss, toxic side reactions and changes in the physical, mechanical and optical properties. Therefore, there has been a growing interest on developing different procedures, such as ultraviolet radiation or the application of microwaves, which are expensive treatments, lead to food alterations and low consumer acceptance (Copetti et al. 2011; Codex Alimentarius Commission 2013).

A green method that have been studied, showing good results is the application of ozone (O<sub>3</sub>) (Calvo et al. 2007; Savi and Scussel 2014; Savi et al. 2014 a,b; Savi et al. 2015). The O<sub>3</sub> gas, apart from its sanitizing features reported in stored grains and nuts, is robust and safer than the conventional ones, acting on a large number of microorganisms (Graham et al. 2011, Giordano et al. 2011, 2012). Its effective use has been reported to control fungi growth, degrading mycotoxins and pesticide residues in a broad variety of raw and processed food, either at postharvest or in the industry (without reducing the nutritional value) (Ong et al. 1996; Mendez et al. 2003; Tiwari et al. 2010; McDonough et al. 2011; Scussel et al. 2011; White et al. 2013; Savi and Scussel 2014; Savi et al. 2015).

Considering the difficulty that dry (post-fermentation) cocoa bean producers and importers face on fungi development during storage and long term transport (ship), we report an investigation on O<sub>3</sub> gas application as a method for *A. flavus* inactivation (at different concentration and time of exposure) in dried in-shell cocoa.

## MATERIAL AND METHODS

**(a) *Sample*:** dry in-shell cocoa beans (10 kg), variety Forasteiro, (moisture content – mc and water activity - aw was 6.9% and 0.62, respectively), year 2014 harvest. Samples were received cleaning and drying and storage unit, packed in a polyethylene bag and stored at 4 °C for analysis.

**(b) *Fungi strains*:** the fungi strains *A. flavus* were obtained from the Laboratory of Mycotoxicology and Food Contaminants culture collection of the Federal University of Santa Catarina.

**(c) *Culture media and chemicals*:** (c.1) *culture media* - potato dextrose agar (PDA) and bacteriological peptone, Himedia (Curitiba, Parana, Brazil); (c.2) *chemicals* - Tween 80, Himedia (Curitiba, Parana, Brazil);

chloramphenicol, Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brazil); sulfuric acid, potassium iodide and sodium thiosulfate (Synth) and lactophenol dye (Fluka).

**(d) Equipment:** microbiological incubator, Quimis (Diadema, SP, Brazil), drying oven, Olidef-cz (Ribeirao Preto, SP, Brazil); autoclave, Phoenix (Araraquara, SP, Brazil), microwave oven, Philco (Sao Paulo, SP, Brazil); laminar flow cabinet, Veco (Campinas, SP, Brazil); O<sub>3</sub> gas generator, model OP-35-5L (Inter ozone); aw meter (Aqualab 4te). Pilot silos (total: 14) of polyvinyl chloride (25 x 10 cm for height and width, respectively) with two apertures for O<sub>3</sub> gas inlet and to exit (at the bottom and top the silos, respectively).

**(e) Sample preparation for O<sub>3</sub> application:** cocoa beans were previously (e.1) *decontamination* - by means of a sodium hypochlorite (5%) solution followed by 3 consecutive rinses with sterile distilled water, then (e.2) *fungi inoculated* - cocoa portions (25 g) were sprayed (5 ml) with known concentration ( $1 \times 10^4$  CFU/ml) of *A. flavus* spores in Tween 80, then separated into two main silos with cocoa Groups (Control: 7 and O<sub>3</sub> treated: 7). Figure 1 shows details of the experiment design.

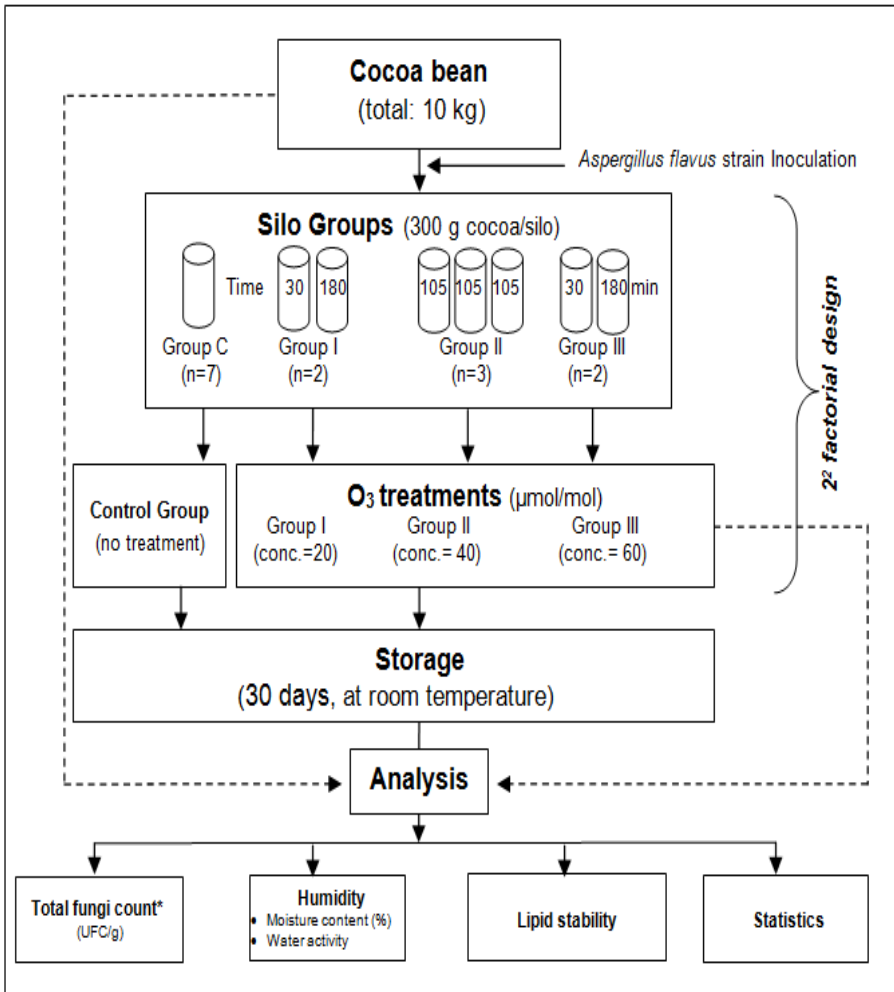
**(f) Silos cocoa loading, O<sub>3</sub> application, storage and sample collection:**  
 (f.1) *loading* - cocoa beans (300 g) were aseptically loaded into the silos (Groups: C and Treated I, II and III); (f.2) *O<sub>3</sub> application*- carried out according to the Giordano et al (2011) method. Briefly, the gas was applied at different concentrations (20, 40 & 60 µmol/mol) keeping the cocoa different times of exposure (30, 105 and 180 min) and stored for one month ( $n=2$ , each Group, except for Group II - Figure 1). Through the silo's bottom aperture (gas inlet) by means of a compressed air pump (connected to the ozonizer - first for impurity removal (through a filter) the room air passed through the calibrated O<sub>3</sub> generator (Corona type) and electrical discharges were produced (between two electrodes) generating O<sub>3</sub>; (f.3) *storage*- cocoa beans were stored for 30 days with temperature and humidity monitored and relative humidity; (f.4) *sample collection for analysis* - cocoa sample portions (25 g) were taken for total fungi load (CFU/g), mc (%), aw and Kreiss analysis (concluded the gas application and the time of cocoa beans exposure, at Day zero and after 30 days) Note: *O<sub>3</sub> concentrations measurement* - each silo O<sub>3</sub> concentration was carried out by iodometric titration [gas was bubbled through an acidified potassium iodide solution (pH <2.0 with sulfuric

acid), then titrated with sodium thiosulfate (0.005 N) using a starch solution as indicator].

**(g) *Experimental design*:** the  $2^2$  factorial design was used to study the (g.1) *influence* of the factors -  $O_3$  gas concentration ( $O_3$ ) and ozonation time ( $t$ ) on the (g.2) *efficiency* of *fungi inactivation* and *humidity / rancidity* possible variation. They were checked immediately (Day zero) and after 30 days of storage. Table 1 and Equation 1 (Eq.1) show the factors levels and model utilized, respectively.

**(h) *Cocoa analysis*:** cocoa samples humidity and lipid oxidation were carried out as follow (h.1) *humidity* - mc was determined by the AOAC gravimetric method 31.1.02 (AOAC, 2005) and aw obtained by measuring each sample in the Aqualab apparatus at 25°C and (h.2) *rancidity* - was according to the official method of the Ministry of Agriculture (MAPA, 1981) based on the reaction of epiphydrilic aldehyde with phloroglucine, which in the presence of hydrochloric acid produces a compound of reddish color.

**(i) *Statistical analysis*:** data obtained were analyzed for the main effects and the variables interactions on responses, determining which was the significant factors ( $p < 0.1$ ) and adjusting a model (Eq 01) to correlate variables and their responses. The significant coefficients of the model were evaluated by the “t” test, and the data were subjected to an analysis of variance (ANOVA), to verify the statistical validity and predictive ability of the models obtained for the answers.



$$[\text{Eq.1}] \hat{y} = b_0 + b_i X_i + b_j X_j + b_{ij} X_i X_j$$

$b_0$ : mean/intercept

$b_i$ ,  $b_j$ ,  $b_{ij}$ : the model of regression coefficients

$X_i(\text{O}_3)$  and  $X_j$  (time): independent factors evaluated in coded values.

**Figure 1.** Flowchart of the cocoa *Aspergillus flavus* inoculated treated with ozone gas.

**Table 1.** Factors levels applied in the cocoa ozone gas and exposure time experimental design

Factor (2) <sup>b</sup>	Symbol	Levels (2) <sup>b</sup>		
		-1	0	+1
O <sub>3</sub> concentration (μmol/mol)	O <sub>3</sub> <sup>a</sup>	20	40	60
O <sub>3</sub> exposure time (min)	T	30	105	180

<sup>a</sup>ozone <sup>b</sup> factorial design (2<sup>2</sup>)

## RESULTS AND DISCUSSION

From the data obtained on cocoa bean O<sub>3</sub> treated to destroy *A. flavus* spores previously inoculated, it was possible to observe that the gas was able to highly reduce the fungus spores levels (inactivating them). That was dependent on the concentration and time of exposure applied though. It also showed not affecting the lipid stability. Table 2 and Figures 2 & 3 show the O<sub>3</sub> effect data on cocoa beans.

### *O<sub>3</sub> Gas Effect on A. flavus Total Load*

The effect of O<sub>3</sub> on the *A. flavus* inoculated cocoa beans (Groups I, II and III) evaluated at Day zero and after 30 days of storage, together with humidity (mc, aw), studied under the factorial designed (2<sup>5</sup>) applied are shown in Table 2 and Figures 2.a,b & 3.a,b. The data obtained were compared to Group C (cocoa without O<sub>3</sub> treatment).

**Table 2** Levels of ozone *Aspergillus flavus* spores decontamination in dry cocoa bean (*Theobroma cacao* L.) at different gas and time conditions

O <sub>3</sub> <sup>a</sup> treatment <sup>b</sup>		<i>Aspergillus flavus</i>							
		Count <sup>c</sup> (x10 CFU/g)				Reduction <sup>d</sup> (%)			
		Control*		O <sub>3</sub> treatment		Storage (Day)		Humidity	
Concentration (μmol/mol)	Time (min)	Zero <sup>δ</sup>	30 <sup>th</sup>	Zero <sup>δ</sup>	30 <sup>th</sup>	Zero <sup>δ</sup>	30 <sup>th</sup>	mc (%)	Aw
20 <sup>e</sup>	30 <sup>e</sup>	56	37	25	5	55.4	86.5	6.0	0.61
60 <sup>g</sup>	30 <sup>g</sup>	55	42	14	2	74.5	95.2	6.9	0.61
20 <sup>e</sup>	180 <sup>e</sup>	51	39	16	3	68.6	92.3	6.8	0.49
60 <sup>g</sup>	180 <sup>g</sup>	53	40	7	NG**	86.8	100.0	7.5	0.52
40 <sup>f</sup>	105 <sup>f</sup>	51	47	17	2	66.7	95.7	6.4	0.53
40 <sup>f</sup>	105 <sup>f</sup>	50	43	20	2	60.0	95.3	6.5	0.56
40 <sup>f</sup>	105 <sup>f</sup>	53	35	18	1	66.0	97.1	6.9	0.51

<sup>a</sup>ozone<sup>b</sup>2<sup>c</sup> factorial design<sup>c</sup> mean<sup>d</sup> efficiency mc: moisture content aw: water activity ozone<sup>e</sup>Group I<sup>f</sup>Group II<sup>g</sup>Group III. \* no gas treatment \*\*no growth<sup>δ</sup> Day



## Day Zero

*CFU/g reduction:* the effect of O<sub>3</sub> concentration and exposure time at Day zero in the fungi spore inactivation (CFU/g) already showed good fungi spores reduction (Figure 2.a.1). Data were considered significant for the "t" test. Increasing the concentration of O<sub>3</sub> from 20 to 60 µmol/mol there was a fungi spores destruction of 10x10 CFU/g i.e., from 20.5x10 (low O<sub>3</sub> concentration) to 10.5x10 CFU/g (higher O<sub>3</sub>). Indeed, when also increasing the cocoa bean ozonation time (from 30 to 180 min) there was a fungi reduction, however from 19.5x10 to 11.5x10 CFU/g (8.0x10 CFU/g destruction / inactivation). The mathematical model (Eq.01) to estimate the reduction in CFU/g depending on the O<sub>3</sub> concentration ( $b_i=5.0$ ), the exposure time ( $b_j=4.0$ ) and mean ( $b_0=16.7$ ) was found to be predictive test by "F", with a correlation coefficient ( $r^2$ ) of 0.89. The surface response (Figure 2.a.2) represents the model.

*Percentage of Efficiency:* the effect of O<sub>3</sub> concentration and exposure time on the inactivating fungi spores efficiency (%) are shown in Figure 2.b.1 (significant for the "t" test). Therefore, increasing the gas concentration from 20 to 60 µmol / mol promotes an increase of 18.7% on fungi strain degradation. Similarly, increasing the ozonation beans exposure time (from 30 to 180 min) there was a direct increase of 12.8% *A. flavus* degradation, i.e. 86.8% when compared to Group C (Table 2). The mathematical model (Eq. 1) for estimating the efficiency depending on the O<sub>3</sub> concentration ( $b_i=9.4$ ), the exposure time ( $b_j=6.4$ ) and mean ( $b_0=68.3$ ) was found to be a predictive test by "F", with a correlation coefficient ( $r^2$ ) of 0.82. The surface response represents the model (Figure 2.b.2). Previous studies with other food products (*peanuts, Brazil nuts, pea and wheat*) corroborate the data obtained in the current work, showing similar fungi reduction (including *A. parasiticus* and other fungi genera / species) (Ciccarese et al. 2007; Scussel et al. 2011; Alencar et al. 2012; El-Desouky et al. 2012; Giordano et al. 2012; Savi et al. 2014b). However, at different conditions who were adjusted to the food type characteristics. Giordano et al. (2012) reported for Brazil nuts O<sub>3</sub> treated that the conditions of 31 µmol/mol concentration and 5 h exposition were able to completely reduce *A. flavus* (100%). Similarly to our results, Savi et al. (2014b) reported *A. flavus* growth inhibition on *wheat* by applying similar conditions (gas concentration / exposure time) of the current work. They reported the best fungi growth reduction at the highest parameters

applied (total inhibition: 60  $\mu\text{mol} / \text{mol}$  & 180 min). Also, El-Desouky et al. (2012) studied the application of  $\text{O}_3$  in *wheat*, at concentration of 40 ppm during 20 min and observed successfully *A. flavus* inhibition.

### **Day 30<sup>th</sup>:**

*CFU/g reduction:* the  $\text{O}_3$  concentration and exposure time effects on the fungi spores' inactivation (CFU/g) data were considered significant for the "t" test (Figure 3.a.1). Increasing the concentration of  $\text{O}_3$  from 20 to 60  $\mu\text{mol/mol}$ , there was a reduction from  $4.0 \times 10$  to  $1.0 \times 10$  CFU/g, ( $3 \times 10$  CFU/g spores destruction) and then with an increase of the ozonation time (from 30 to 180 min) there was also, a reduction from  $3.5 \times 10$  to  $1.5 \times 10$  CFU/g. The mathematical model (Eq. 1) for estimating the reduction in CFU/g depending on the concentration of  $\text{O}_3$  ( $b_i=1.5$ ), the exposure time ( $b_j=1.0$ ) and mean ( $b_0=2.14$ ) was found to be predictive test by "F", with a correlation coefficient ( $r^2$ ) of 0.88. The surface response (Figure 3.a.2) represents the model.

*Percentage of Efficiency:* on the other hand, after 30 days of storage the number of viable spores reduced, presenting a latent effect, shown in Figure 3 (b.1) (significant for the "t" test). Increasing from 20 to 60  $\mu\text{mol} / \text{mol}$  the concentration of  $\text{O}_3$  promotes an efficiency increase of 5.6%. In addition, also with the increase of ozonation time (from 30 to 180 min) there was an efficiency increasing 3.3%, i.e. 100% degradation compared to Group C (Table 2). Those findings also were corroborated by different authors that studied  $\text{O}_3$  application and different foods, such as nuts and grains (Ciccarezi et al. 2007; Giordano et al. 2011, 2012; Alencar et al. 2012; El-Dzouky et al. 2012; Savi et al. 2014b). The mathematical model (Eq. 1) for estimating the efficiency depending on the concentration of  $\text{O}_3$  ( $b_i=2.8$ ), the exposure time ( $b_j=1.7$ ) and mean ( $b_0=95.9$ ) was found to be predictive test by "F", with a correlation coefficient ( $r^2$ ) of 0.88. The surface response (Figure 3.b.2) represents the model.

### **Humidity and Lipid Stability**

*Humidity:* the mc of the cocoa after treatment with  $\text{O}_3$  presented reached a mean of 6.2% (min 5.9; max 6.5) and there were no statistical differences in mc between treatments ( $p<0.1$ ). After 30 days of storage, cocoa had a mean mc of 6.7% (min 6.4; max 7.0), statistically similar for all treatments ( $p<0.1$ ). This increase in mc of 1% after the  $\text{O}_3$  treatment

and 30 days of storage is probably because of the environment temperature that somewhat reduced ( $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ -min:19; max:24) and the relative humidity somewhat higher at the end of experiment ( $65\pm 1\%$ -min 65; max 82) by the time the experiment was carried out, which established a new equilibrium of mc. There was no statistical differences among the mcs throughout the  $\text{O}_3$  treatments, which corroborates to fact that there was no mc influence on the cocoa bean treatments responses (Giordano et al. 2011; Scussel et al. 2011). Similar to the mc of the cocoa, aw value of 0.55 after the  $\text{O}_3$  treatment and 0.6 after 30 days of storage, did not differ between treatments in both periods of time ( $p < 0.1$ ).

*Lipid stability to  $\text{O}_3$* : from the data obtained with Kreiss test, cocoa  $\text{O}_3$  treated showed no lipid oxidation. The analysis was repeated after 30 days of storage, and the samples, again, showed no rancidity development. Others studies on  $\text{O}_3$  decontamination, also utilizing products containing high lipid contents (Brazil nuts and peanuts) reported no changes on lipids stability (Scussel et al. 2011; Giordano et al. 2012; Alencar et al. 2011; Chen et al. 2014).

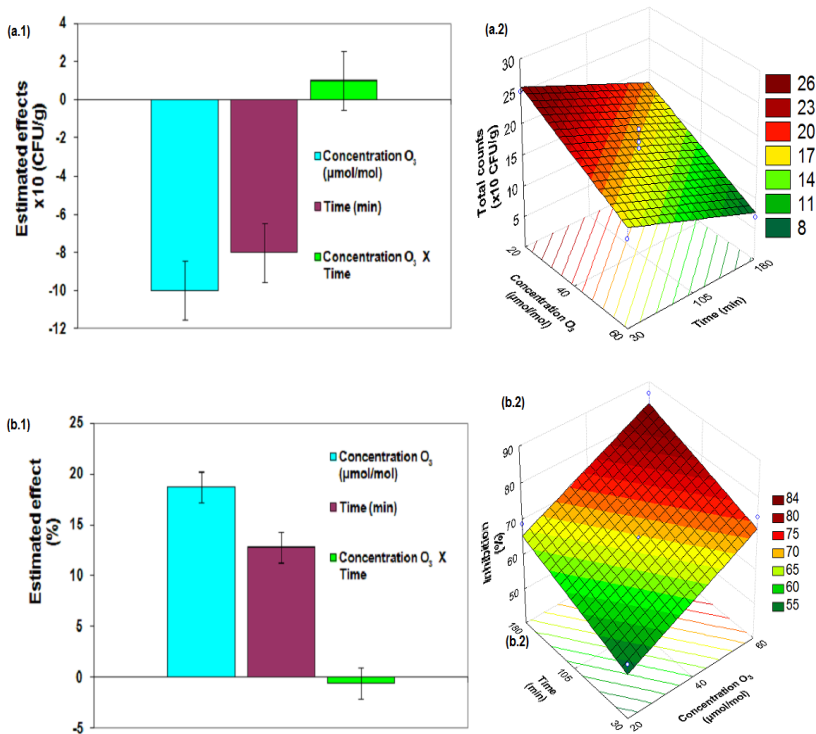
## CONCLUSIONS

*A. flavus* can be efficiently destroyed by the  $\text{O}_3$  gas under the conditions of 60  $\mu\text{mol/mol}$  and 180 min (100% of spores did not germinate).

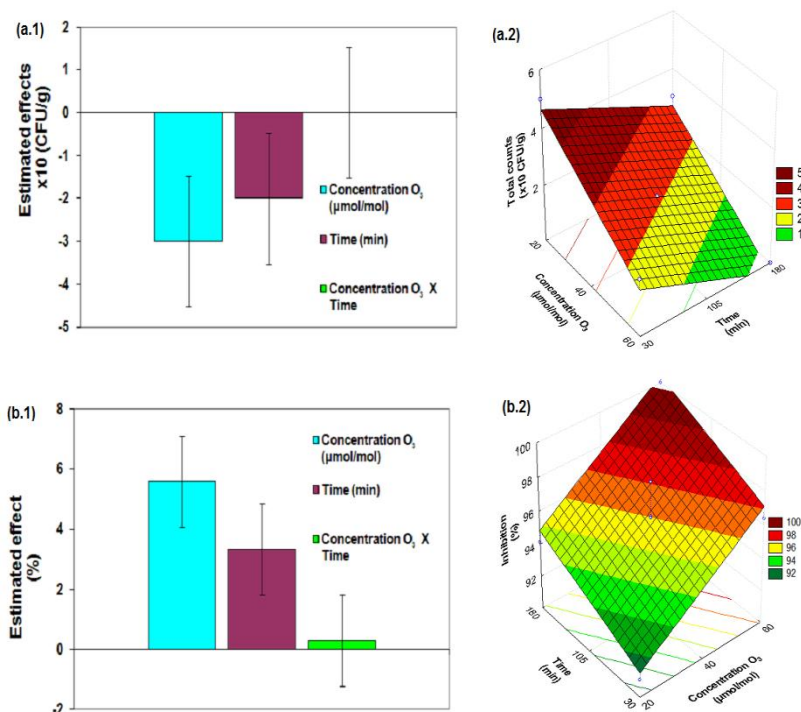
There was no lipid oxidation within the 30 days after the  $\text{O}_3$  application nor inadequate variation of mc and aw.

The effect of increasing the  $\text{O}_3$  concentration was higher than the increase on exposure time for the destruction of *A. flavus* in the cocoa.

It is important to emphasize that according to our knowledge, this is the first work that has assessed the effect of  $\text{O}_3$  on *A. flavus* in cocoa bean.



**Figure 2.** Effect of O<sub>3</sub> concentration (20 / 40 / 60 μmol/mol) and time of exposure (20 / 105 / 180 min) in cocoa *Aspergillus flavus* inoculated on (a) total load (CFU) inhibition [(a.1) estimated and (a.2) response surface]; (b) total reduction (%) [(b.1) effect estimated and (b.2) response surface] – DAY ZERO.



**Figure 3.** Effect of O<sub>3</sub> concentration (20 / 40 / 60 μmol/mol) and time of exposure (20 / 105 / 180 min) in cocoa *Aspergillus flavus* inoculated on (a) total load (CFU) inhibition [(a.1)estimated and (a.2) response surface]; (b) total reduction (%) [(b.1) effect estimated and (b.2) response surface] – DAY 30<sup>th</sup>.

## REFERENCES

- Alencar, E.R., D'Antonino Faroni, L.R., Ferreira Soares, N.F., da Silva, W.A.,da Silva Carvalho, M.C. 2012. Efficacy of ozone as a fungicidal and detoxifying agent of aflatoxins in peanuts. *J. Sci. Food Agric.* 92 (4):899-905.
- Alencar, E.R.d., Faroni, L.R.D., Martins, M.A., Costa, A.R.d.,Cecon, P.R. 2011. Decomposition kinetics of gaseous ozone in peanuts. *Eng. Agric.* 31:930-939.

- AOAC - Association Official Method of Analysis of AOAC  
Internacional. 2005. Thiex, NJW ed, *Official Methods of Analysis*.  
18.ed. Maryland.
- Ardhana, M.M., Fleet, G.H. 2003. The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *Intl J Food Microbiol.* 86, 87–99.
- Calvo, I., Muguerza, B., Cienfuegos-Jovellanos, E. 2007. Microbial inactivation and butter extraction in a cocoa derivative using high pressure CO<sub>2</sub>. *The J. Supercrit. Fluids* 42 (1):80-87.
- Chen, R., Ma, F., Li, P.-W., Zhang, W., Ding, X.-X., Zhang, Q., Li, M., Wang, Y.-R., Xu, B.-C. 2014. Effect of ozone on aflatoxins detoxification and nutritional quality of peanuts. *Food Chemistry* 146:284-288.
- Ciccarese, F., Sasanelli, N., Ciccarese, A., Ziadi, T., L. Mancini. 2007. Seed disinfestation by ozone treatments. Paper read at IOA Conference and Exhibition, October 29 – 31, at Valencia, Spain.
- Codex Alimentarius Commission. 2013. Proposed draft code of practice for the prevention and reduction of ochratoxin A contamination in cocoa. Joint FAO/WHO Food Standards Program, FAO, Rome ([ftp://ftp.fao.org/codex/meetings/cccf/ccccf7/cf07\\_09e.pdf](ftp://ftp.fao.org/codex/meetings/cccf/ccccf7/cf07_09e.pdf)). Accessed on 18/09/2014).
- Copetti, M.V., Pereira, J.L., Iamanaka, B.T., Pitt, J.I., Taniwaki, M.H. 2010. Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in cocoa during farm processing. *Intl J Food Microbiol.* 143, 67–70.
- Copetti, M. V et al. 2011. Aflatoxigenic fungi and aflatoxin in cocoa. *Intl J Food Microbiol.* 148, 2, 141–4.
- El-Desouky, T.A., Sharoba, A.M.A., El-Desouky, A.I., El-Mansy, H.A., Naguib, K. 2012. Effect of ozone gas on degradation of aflatoxin B1 and *Aspergillus flavus* fungal. *J. Environ. Anal. Toxicol.* 2 (2):128-133.
- Giordano, B.N.E., Simão, V., Scussel, V.M. 2011. Effect of O<sub>3</sub> gas on Brazil nut mycoflora and aflatoxin reduction. In: *Controlled Atmosphere and Fumigation in Stored Products*, Chengdu, China.

- Proc. of 8th Int. Conf. on Controlled Atmosphere & Fumigation in Stored Products. Chengdu, China, 214-220p.
- Giordano, B.N.E., Nones, J., Scussel, V.M. 2012. Susceptibility of the in-shell Brazil nut mycoflora and aflatoxin contamination to ozone gas treatment during storage. *J. Agric. Sci.* 4 (8):1-10.
- Graham, T., Zhang, P., Woyzbun, E., Dixon, M. 2011. Response of hydroponic tomato to daily applications of aqueous ozone via drip irrigation. *Sci. Horticult.*, 129, 464–471.
- IARC. 1993. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans: Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. Lyon, France: Intl Agency Res. Cancer, 56, 489–521.
- Kreibich, H.H., Savi, G.D., Moecke, E., Scussel, V. M. 2014. Easter eggs and other cocoa (*Theobroma cacao* L.) products quality: insects, mites, fungi and packaging versus critical control points. *Intl J. Applied Sci. Technol.*, 4., 5.
- Kreibich, H.H., Moecke, E., Scussel, V. M. 2015a. Cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans processing and storage conditions control for safe chocolate products. Proceedings of 11<sup>th</sup> IWCSPP, in press.
- Kreibich, H.H., Moecke, E., Scussel, V. M. 2015b. Biological contaminants control strategies for cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) better quality. Intl Coffee, Cocoa and Tea Conf. Aveiro, Portugal.
- Leung, M.C.K., Diaz-Llano, G., Smith, T.K. 2006. Mycotoxins in pet food: a review on worldwide prevalence and preventative strategies. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 9.623-9.635.
- MAPA -Brazilian Ministry of Agriculture. 1981. Oxidative rancidity analysis <<http://www.agricultura.gov.br>
- McDonough, M.X., Campabadal, C.A., Mason, L.J., Maier, D.E., Denvir, A., Woloshuk, C. 2011. Ozone application in a modified screw conveyor to treat grain for insect pests, fungal contaminants, and mycotoxins. *J. Stored Prod. Res.* 47 (3):249-254.

- Mendez, F., Maier, D.E., Mason, L.J., Woloshuk, C.P. 2003. Penetration of ozone into columns of stored grains and effects on chemical composition and processing performance. *J. Stored Prod. Res.* 39 (1):33-44.
- Mounjouenpou, P., Gueule, D., Fontana-Tachon, A., Guyot, B., Tondje, P.R., Guiraud, J.P. 2008. Filamentous fungi producing ochratoxin A during cocoa processing in Cameroon. *Intl J Food Microbiol.* 128, 234–241.
- Ong, K.C., Cash, J.N., Zabik, M.J., Siddiq, M., Jones, A.L. 1996. Chlorine and ozone washes for pesticide removal from apples and processed apple sauce. *Food Chem.* 55 (2):153-160.
- Ostovar, K., Keeney, P.G. 1973. Isolation and characterization of microorganisms involved in the fermentation of Trinidad's cacao beans. *J. Food Sci.* 38, 611–617.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D. 2009. *Fungi and Food Spoilage*, third ed. Springer, New York.
- Ragni, L.; Berardinelli, A.; Vannini, L.; Montanari, C.; Sirri, F.; Guerzoni, M.E. Non-thermal atmospheric gas plasma device for surface decontamination of shell eggs. *Intl. J. F. Engineering*, [doi: 10.1016/j.jfoodeng.2010.03.036], 100(1):125- 32, 2010.
- Ribeiro, N.C.A., Bezerra, J.L., Lopez, A. 1986. Micobiota na fermentação do cacau no estado da Bahia, Brasil. *Rev. Theobroma* 16, 47–55.
- Sanchez-Hervas, M., Gil, J.V., Bisbal, F., Ramon, D., Martinez-Culebras, P.V. 2008. Mycobiota and mycotoxin producing fungi from cocoa beans. *Intl J Food Microbiol.* 125 (3), 336–340.
- Savi, G.D., Scussel, V.M. 2014. Effects of ozone gas exposure on toxigenic fungi species from *Fusarium*, *Aspergillus*, and *Penicillium* genera. *Ozone-Sc. Eng.* 36 (2):144-152.
- Savi, G.D., Piacentini, K.C., Bittencourt, K.O., Scussel, V.M. 2014a. Ozone treatment efficiency on *Fusarium graminearum* and



- deoxynivalenol degradation and its effects on whole wheat grains (*Triticum aestivum* L.) quality and germination. *J. Stored Prod. Res.* 59, 245-253.
- Savi, G.D., Piacentini, K.C., Scussel, V.M. 2014b. Ozone treatment efficiency in *Aspergillus* and *Penicillium* growth inhibition and mycotoxin degradation of stored wheat grains (*Triticum aestivum* L.). *J. Food Proc. Preserv.* 1-9.
- Savi, G.D., Piacentini, K.C., Scussel, V.M. 2015. Reduction in residues of deltamethrin and fenitrothion on stored wheat grains by ozone gas. *J. Stored Prod. Res.* 61, 65-69.
- Schwan, R.F., Wheals, A.E. 2004. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Critical Reviews in Food Sci. Nutr.* 44, 1-17.
- Scussel, V.M. 2004. Aflatoxin and food safety: recent South American perspectives. *J. Toxicol.* 23(2): 179-216.
- Scussel, V.M. 2002. Mycotoxins in Storage Grains. In: Lorini, I.; Miike, L.H.; Scussel, V.M., *Armazenagem de Grãos* Chap 9.2 ed. Bio Geniziz, 693-737, Campinas, SP, Brazil
- Scussel, V.M., Giordano, B.N., Simao, V., Manfio, D., Galvao, S., Ferreira Rodrigues, M.N. 2011. Effect of oxygen-reducing atmospheres on the safety of packaged shelled brazil nuts during storage. *Intl. J. Anal. Chem.* 1-9.
- Tiwari, B.K., Brennan, C.S., Curran, T., Gallagher, E., Cullen, P.J., O'Donnell, C.P. 2010. Application of ozone in grain processing. *J. Cereal Sci.* 51 (3):248-255.
- White, S.D., Murphy, P.T., Leandro, L.F., Bern, C.J., Beattie, S.E., van Leeuwen, J. 2013. Mycoflora of high-moisture maize treated with ozone. *J. Stored Prod. Res.* 55, 84-89.
- Wilson, D.M., Payne, G.A. 1994. Factors affecting *Aspergillus flavus* group infection and aflatoxin contamination of crops. In: Eaton,

D.L., Groopman, J.D. (Eds.), *The Toxicology of Aflatoxins. Human Health, Veterinary, and Agricultural Significance*. Academic Press, San Diego, pp. 383–406.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A avaliação das características e integridade de produtos de chocolate foram registrados danos em 9% das embalagens (manchas e perfurações), contribuindo para a contaminação do produto (larvas vivas). Com relação ao produto interno, 15% das amostras analisadas apresentaram: manchas, aroma acentuado de gordura, além de perfurações e larvas vivas.

Além disso, foram detectados 53% de sujidades leves, sendo 3, 41, 9, 18 e 18% das amostras apresentando insetos (inteiros / fragmentos), larvas (vivas / metamorfose) e ácaros. Os fungos foram isolados em 41% do total de amostras, sendo *Penicillium*, *Aspergillus* e *Rhizopus* spp em 19, 18 e 4% das amostras, respectivamente. Os principais PCs de contaminação identificados foram: a recepção de matérias-primas, fabricação de chocolate e embalagens.

No que diz respeito as instalações de fazendas e armazéns, foram avaliadas a segurança das amêndoas de cacau nas etapas de processamento, instalações de armazenagem contra sua exposição às condições ambientais.

Foi registrado uma média de 75% (min 60; 90 max) de umidade relativa e 25°C (20 min; 35max) de temperatura, sendo que 67% das instalações das fazendas e armazéns de cacau não apresentaram ambiente automatizado (equipamento de aeração / T°C). Diante dos resultados, a proliferação de insetos e a deterioração por fungos foram encontrados em 50% dos armazéns.

Em segundo momento, o O<sub>3</sub> gasoso foi utilizado como método químico de descontaminação para avaliar o mecanismo de ação deste descontaminante frente ao fungo de armazenamento, *A. flavus*. Na maior concentração de O<sub>3</sub> (60 µmol/mol), *A. flavus* foi completamente inibido após 180 min de exposição. Não houve oxidação lipídica no prazo de 30 dias após a aplicação de O<sub>3</sub>, nem variação inadequada de atividade de água e umidade.

Diante dos resultados encontrados neste trabalho, podemos verificar que a descontaminação com gás ozônio demonstrou ser um método químico promissor a ser aplicado nas indústrias e unidades armazenadoras durante o período de armazenamento das amêndoas de cacau, a fim de reduzir a contaminação e garantir a segurança alimentar do consumidor, especialmente por ter vantagens de ser internacionalmente reconhecido como seguro e não deixar resíduos nos alimentos.

O conhecimento dos níveis de contaminação de amêndoas de cacau e produtos de chocolates utilizados na pesquisa são essenciais para adoção de medidas de controle e estratégias de descontaminação para eliminar e/ou reduzir estes contaminantes.

## **Trabalhos Futuros**

Estudos mais específicos deverão ser feitos para visualizar e analisar as alterações indesejáveis que ocorrem na microestrutura das amêndoas de cacau. Para isso, é necessário caracterizar superfícies e microestrutura de cotilédones da amêndoa, sua superfície externa (casca), bem como descrever sua organização interna e superfície celular através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET).

Com relação a descontaminação de amêndoas de cacau, faz-se necessário o estudo de outros métodos comparativos de descontaminação. A tecnologia de plasma se encaixa perfeitamente no contexto do desenvolvimento sustentável, fruto da interseção entre o universo das necessidades sociais, ecológicas e necessidades econômicas, dependendo crucialmente da capacidade das empresas, governos e sociedade em geral em produzir e reciclar de forma eficiente, limpa e econômica todos os produtos industriais e manufaturados por eles gerados. Assim, há uma necessidade inadiável de produzir uma tecnologia limpa e a descontaminação do plasma é a que menos agride o meio ambiente, gerando resíduos recicláveis em amêndoas de cacau.

Este estudo servirá de referência para avaliações futuras das mudanças micro- estruturais que ocorrem nas amêndoas após seu processamento, além de estabelecer medidas comparativas em descontaminação de amêndoas de cacau através do plasma e demais métodos utilizados em pesquisas.

## ANEXOS

- 1.1. Artigo publicado pela revista Internacional Journal of Applied Science and Technology - **Easter eggs and other cocoa (*Theobroma cacao* L.) products quality: insects, mites, fungi and packaging versus control points.**

*International Journal of Applied Science and Technology*

*Vol. 4, No. 5, October 2014*

### **Easter Eggs and Other Cocoa (*Theobroma cacao* L.) Products Quality: Insects, Mites, Fungi and Packaging versus Critical Control Points**

**Heloisa H. Kreibich**

**Geovana D. Savi**


**Vildes M. Scussel**

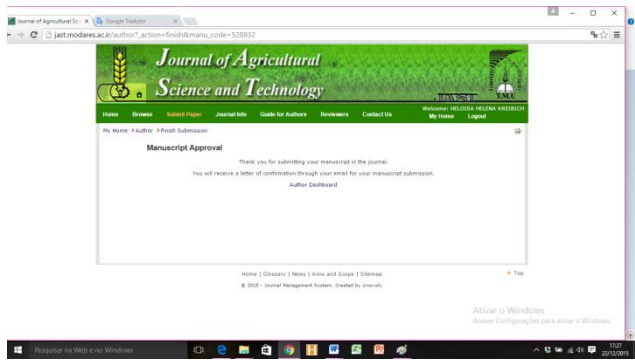
Laboratory of Mycotoxicology and Food Contaminants  
Food Science and Technology Department  
Center of Agricultural Sciences  
Federal University of Santa Catarina  
Rodovia Ademar Gonzaga  
Santa Catarina, Brazil

**Elisa Moecke**

Laboratory of Microscopy  
Food Science and Technology Department  
Center of Agricultural Sciences  
Federal University of Santa Catarina  
Rodovia Ademar Gonzaga

- 1.2. Artigo submetido pela revista Journal of Agricultural Science and Technology - **Cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans processing and storage conditions control for safe chocolate products.**

<b>Comments</b>	<p>This study evaluated the conditions of cocoa beans from the producing cocoa farms (48) and warehouses (12) located in the Northeastern Brazil, during five months (March to July 2014). The parameters investigated were storage facilities: silos types &amp; material; environmental conditions exposure: rain precipitation/relative humidity (RH) / temperatures; cocoa bean batches: humidity (moisture content-mc/water activity-aw); living organisms: insect/fungi toxins and cocoa bags materials: raffia/jute/ polyethylene layers. Green methods of prevention/control/decontamination were recommended. Application of controlled atmospheres (vacuum/ozone/hermeticity, through cocoon in-container for export) was recommended and improvement of bags material and thermometry inclusion in some of the facilities too. That will be the next steps of the Cocoa Project.</p>							
<b>Authors</b>								
#	Name	Email Address	Education	Degree	Phone	Country	City	Affiliation
1	HELOISA HELENA KREIBICH*	heloisauufsc@hotmail.com	MSc Student	Other	55-48-3721-5387	Brazil		Federal University of Santa Catarina
2	ELISA HELENA MOECKE	smoecke@gmail.com	PhD	Professor	55-48-3721-5387	Brazil		Federal University of Santa Catarina
3	VILDES MARIA SCUSSEL	vildescussel_2000@yahoo.co.uk	PhD	Professor	55-48-3721-5387	Brazil		Federal University of Santa Catarina
<b>Cover Letter</b>								
<b>Checklist</b>								
<b>Related Files</b>								
#	File Type	File Name	Size	File Description	Upload Date	Download		
1	Manuscript Main	tailandia para formatar para revista em 22 Jan 2015	1899.17 KB		2015-12-22			



1.3. Artigo submetido oeka revista Ozone: Science & Engineering  
**Decontamination of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) inoculated with *aspergillus flavus* by ozone gas.**

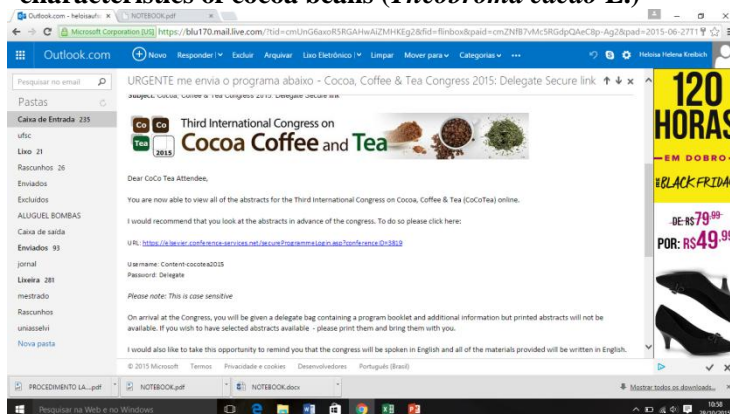


**DECONTAMINATION OF COCOA BEANS (*Theobroma cacao* L.) INOCULATED WITH *Aspergillus flavus* BY OZONE GAS**

Journal:	Ozone: Science & Engineering
Manuscript ID	BOSE-2015-0084
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	27-Nov-2015
Complete List of Authors:	KREIBICH, HELOISA; University Federal of Santa Catarina Christ, Divair; UNIOESTE – Western Paraná State University STILVA, JULIANA; University Federal of Santa Catarina Savi, Geovana; LABMICO, Food Science and Technology Department, Centre of Agricultural Sciences, Federal University of Santa Catarina, Rod. Admar Gonzaga, Itacorubi, 1346, Florianópolis, SC, Brazil, Scussel, Vildes; LABMICO, Food Science and Technology Department, Centre of Agricultural Sciences, Federal University of Santa Catarina, Rod. Admar Gonzaga, Itacorubi, 1346, Florianópolis, SC, Brazil,

Ativar o  
Acesse Co

#### 1.4 Apresentação oral – 2015 - Third Internacional Congress on Cocoa and Tea - Portugal – 2015 - **Safety and microstructure characteristics of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.)**



#### 1.5 Resumo da apresentação oral – 2015 - Third Internacional Congress on Cocoa and Tea - Portugal – 2015 - **Safety and microstructure characteristics of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.)**

**[F.F.C.12] - APRESENTAÇÃO ORAL**  
**Safety and microstructure characteristics of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.)**  
 H. Kreibich, E. Moecke, V. Scussel\*  
 Federal University of Santa Catarina, Brazil

This study reports the cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) spoilage susceptible morphohistological characteristics, fungi infection (shell and edible part), biological contaminants and possible steps of fungi / toxins entrance / contamination through the scanning electron microscopies (SEM). Cocoa beans samples (60) were collected (2014 harvest season) from Northeastern Brazil farms. The methodology applied for analysis of beans SEM characteristics; light filth and fungi were of Scussel et al (2014); AOAC (2005) and Smith et al. (2010) & Pitt (1979), respectively. Regarding SEM evaluation, the following characteristics related to (a) morphology (that allow fungi and insects entrance into/in-between cocoa cotyledons) and (b) histology (cells different structures that may allow humidity absorption, improving environment conditions for living organisms development) of bean *testae* (both cocoa surfaces - inner/outer) and cotyledons (different cells layers and lipid bodies) were checked. Including some spoilage (fungi infected and insects/larvae infested) at 2 amplifications (x500 and x3.000 at 0.5 to 30 kV). The histological characteristics, which allows water absorption registered by SEM were cell walls (porosity) and the differences on hard & soft tissues. It was observed, the presence of light filths in 53% (32 / 60) of the analyses samples. Fungi were isolated in 35% of samples for the *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. These results may serve as subsidies chocolate industries

## 1.6 Resumo e pôster – 2015 - Third Internacional Congress on Cocoa and Tea - Portugal – 2015 – **Biological contaminants control strategies for cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) better quality.**

[P.FT.33]

### **Biological contaminants control strategies for cocoa beans (*theobroma cacao* L.) better quality**

H. Kreibich, G. Savi, K. Piacentini, D. Marchi, L. Colleti, E. Moecke, V. Scussel\*  
Federal University of Santa Catarina, Brazil

The conditions of cocoa beans (60) from the producing cocoa Brazilian farms (48) and warehouses (12), from March to July 2014 were evaluated. The parameters investigated were *living organisms*: insect/fungi toxins; *mycotoxins*: aflatoxins; *storage facilities*: silos types & material (vertical or horizontal/wooden or metal/with or no thermometry); *environmental conditions exposure*: rain precipitation / relative humidity (RH) / temperatures and humidity (moisture content-mc/water activity- $a_w$ ). Aflatoxigenic fungi were isolated and identified by standard techniques. Only 35 % of the samples had them grown, however at rather low count ( $1 \times 10^1$  to  $3.5 \times 10^2$  UFC/g). Despite of the low fungi load, from the 35% of the samples fungi strains isolated (16.7, 16.8 and 1.7 %) were of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*, respectively. The toxigenic fungi isolated were *Aspergillus flavus*, *A. flavipes* e *A. ochraceus*. From the farms and warehouse storage facilities evaluated, 67% of them did not have automatic environment, control settings and 33% apply high storage technology. Regarding external and internal warehouse conditions of RH and temperatures, they reached mean of 75% and 25°C, respectively. In spite of the high prevalence of aflatoxigenic fungi, only quite low levels of aflatoxin were found in the cocoa samples (bellow the HPLC method LOQ), suggesting the existence of limiting factors to the accumulation of those toxins in the cocoa beans. Application of controlled atmospheres (vacuum/ozone/hermeticity, through cocoon in-container for export) was recommended and improvement of bags material and thermometry inclusion in some of the facilities too. These results may serve as subsidies to chocolate industries to ensure that safety continues from the beans production (raw materials) to chocolate processing (final product) and marketing.

Keywords: coca, chocolate, quality, contaminants